

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Année scolaire 1912-1913. — N° 95

ÉTUDE DE LEVURES

RENCONTRÉES

DANS LA PULPE VACCINALE

(Travail du Bureau municipal d'Hygiène et du laboratoire de Pathologie générale)

~~~~~

## THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Et soutenue publiquement le 30 juin 1913

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

**Léonce MAGNIN**

LICENCIÉ ÈS SCIENCES

Né à Beynost (Ain), le 1<sup>er</sup> août 1889

—————

BESANÇON

IMPRIMERIE JACQUES ET DEMONTROND

—

1913



# ÉTUDE DE LEVURES

RENCONTRÉES

DANS LA PULPE VACCINALE



FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Année scolaire 1912-1913. — N° 95

---

# ÉTUDE DE LEVURES

RENCONTRÉES

DANS LA PULPE VACCINALE

(Travail du Bureau municipal d'Hygiène et du laboratoire de Pathologie générale)

~~~~~

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Et soutenue publiquement le 30 juin 1913

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Léonce MAGNIN

LICENCIÉ ÈS SCIENCES

Né à Beynost (Ain), le 1^{er} août 1889

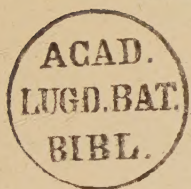
—————

BESANÇON

IMPRIMERIE JACQUES ET DEMONTROND

—

1913



PERSONNEL DE LA FACULTÉ

MM. HUGGONENQ DOYEN.
J. COURMONT ASSESSEUR.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. CHAUVEAU, AUGAGNEUR, SOULIER, TRIPIER, CAZENEUVE, LÉPINE, PIERRET
BEAUVISAGE.

PROFESSEURS

Cliniques médicales.	MM. TEISSIER
Cliniques chirurgicales.	ROQUE
Clinique obstétricale et Accouchements	BARD
Clinique ophtalmologique	PONCET
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	JABOULAY
Clinique des maladies mentales	FABRE
Clinique des maladies des enfants.	ROLLET
Clinique des maladies des femmes	NICOLAS
Physique médicale.	LÉPINE (J.)
Chimie médicale et pharmaceutique.	WEILL
Chimie organique et Toxicologie	POLLOSSON (A.)
Matière médicale et Botanique.	CLUZET
Parasitologie et Histoire naturelle médicale	HUGGONENQ
Anatomie.	MOREL
Anatomie générale et Histologie	MOREAU
Physiologie	GUIART
Pathologie interne.	TESTUT
Pathologie et Thérapeutique générales	RENAUT
Anatomie pathologique	MORAT
Médecine opératoire	COLLET
Médecine expérimentale et comparée	LESIEUR
Médecine légale.	PAVIOT
Hygiène	POLLOSSON (M.)
Thérapeutique	COURMONT (P.)
Pharmacologie	LACASSAGNE
	COURMONT (J.)
	PIC
	FLORENCE

PROFESSEURS ADJOINTS

Physiologie, cours complémentaire	MM. DOYON
Maladies des oreilles, du nez et du larynx.	LANNOIS
Pathologie externe.	VALLAS
Maladies des voix urinaires.	ROCHET

CHARGÉS DE COURS COMPLÉMENTAIRES

Chimie minérale	MM. BARRAL, agrégé
Propédeutique chirurgicale	BÉRARD, —
Propédeutique de gynécologie	CONDAMIN, —
Chirurgie infantile.	NOVÉ-JOSSERAND, ag.
Accouchements.	COMMANDEUR —
Embryologie.	REGAUD, —
Anatomie topographique	PATEL, —
Botanique.	BRETIN, —
Chirurgie expérimentale.	VILLARD, —
Clinique infantile	MOURIQUAND, —
Propédeutique urologique	GAYET, —
Déontologie et médecine professionnelle	(Et.) MARTIN, —

AGRÉGÉS

MM.	MM.	MM.	MM.
REGAUD	Etienne MARTIN	BRETIN	MOURIQUAND
COMMANDEUR	LAROYENNE	LERICHE	ARLOING (F.)
GAYET	VORON	THEVENOT	GUILLESMARD
NEVEU-LEMAIRE	NOGIER	TAVERNIER	PIERY, ch....
PATEL	LATARJET	CADE	SAVY, ch....

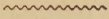
M. BAYLE, Secrétaire.

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

MM. LESIEUR, *Président* ; PIC, *Assesseur* ;
MM. PI. COURMONT, *Professeur*, et BRETIN, *Agrégé*.

La Faculté de médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.

INTRODUCTION



Le virus vaccinal a déjà été l'objet de nombreuses recherches, et l'étude particulière de la *flore du vaccin* a suscité la publication d'importants travaux. Cependant, bien des points restent à élucider, notamment le rôle que peuvent jouer les microorganismes pour lesquels la lymphe est un excellent milieu de culture. Parmi ces microbes, plusieurs auteurs signalent la présence de levures; mais ces champignons n'ayant pas été isolés spécifiquement, le rôle qu'ils peuvent remplir n'a pu être envisagé jusqu'ici que d'une manière hypothétique. C'est dans l'espoir d'apporter quelques éclaircissements à ce sujet que, sur les conseils du professeur LESIEUR, nous avons entrepris ce travail.

L'étude délicate des levures nous a été facilitée par l'amabilité de plusieurs personnes que nous nous faisons un devoir de remercier ici : M. LESIEUR, professeur de pathologie et thérapeutique générales à la Faculté de médecine, directeur du bureau municipal d'hygiène, a bien voulu nous indiquer ce sujet de thèse et accepter la présidence du jury chargé de l'examiner; ses conseils de chaque instant nous ont été précieux. MM. J. BEAUVÉRIE, maître de conférences à la Faculté des sciences

de Nancy, GUILLIERMOND, chargé de cours à la Faculté des sciences de Lyon, nous ont été d'un utile secours dans l'étude botanique des levures, spécialité qui leur est familière. M. le professeur GÉRARD a eu l'obligeance de mettre à notre disposition les ressources du laboratoire de botanique de la Faculté des sciences de Lyon, où nous avons trouvé une partie du matériel nécessaire pour exécuter ce travail.

MM. FAUCHERON, J. RAY, maître de conférences à la Faculté des sciences, le docteur ROCHAIX, M. DÉRUELLE, directeur du service d'inspection des viandes, ont également bien voulu nous donner d'utiles renseignements.

Nous n'oublierons pas d'apporter notre tribut de reconnaissance à nos maîtres de la Faculté de médecine et des hôpitaux de Lyon, de la Faculté des sciences, de l'École de médecine et des hôpitaux de Besançon.

Nous sommes particulièrement reconnaissant à MM. les professeurs J. COURMONT, LESIEUR, ROLLET, qui nous ont admis dans leurs laboratoires, soit à la Faculté, soit dans les hôpitaux; à MM. les professeurs PIC et P. COURMONT qui ont aimablement accepté de faire partie du jury d'examen de cette thèse, ainsi que M. le professeur agrégé BRETIN; à M. le professeur GUIART et M. le professeur agrégé SAVY; nos remerciements s'adressent aussi à MM. les docteurs BORY, VIGNE, à MM. MOURIER DES GAYETS et E. MAGNIN, qui nous ont facilité certaines parties de ce travail.

A Besançon, nous sommes heureux de pouvoir rendre hommage à l'enseignement de MM. les professeurs MAGNIN, FOURNIER et CHARBONNEL-SALLE, BOUTROUX et PERREAU, de la Faculté des sciences; du docteur PRIEUR,

directeur de l'École de médecine; du docteur MARÉCHAL, directeur du laboratoire de bactériologie; des docteurs BAIGUE, chef du service de la Maternité; BRUNSCHWIG, CHAPOY, GAUDERON, HEITZ, HYENNE, LEDOUX, MANDE-REAU, MARCEAU, MORIN, ROLAND, THOUVENIN et TISSERAND, professeurs à l'École de médecine et de pharmacie.

Je suis heureux que mon premier travail de recherches botaniques me fournisse l'occasion d'exprimer à mon père, le docteur Ant. MAGNIN, professeur à la Faculté des sciences et à l'École de médecine, mes sentiments d'affectueuse gratitude pour les conseils et l'aide qu'il m'a donnés dans le cours de mes études scientifiques.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

PREMIÈRE PARTIE

HISTORIQUE ET MÉTHODE



CHAPITRE PREMIER

HISTORIQUE DE L'ÉTUDE DES LEVURES DU VACCIN

Pendant longtemps, la lymphé vaccinale a été considérée comme dépourvue d'éléments organisés et l'on préconisait une lymphé limpide et transparente pour la vaccination. C'est en novembre 1867 que les *Archives* de VIRCHOW publient le premier travail où il soit question des éléments microscopiques de ce liquide. Dans cet article, HALLIER et ZURN [CXIII] ¹ décrivent des cellules à noyaux qu'ils avaient rencontrées dans la lymphé de veau fournie par l'Institut de vaccination de Hambourg. Ces auteurs annoncent une série de cultures qui détermineront l'importance que ces formations peuvent avoir dans le processus de la maladie et au point de vue de la nature du virus variolique. A peu près en même temps, paraît le travail de KEBER : « Sur les éléments microscopiques de la lymphé vaccinale [CXXI]. » Nous

1. Les chiffres romains entre crochets renvoient aux numéros de la bibliographie.

reproduisons ici les passages les plus intéressants de ce mémoire : « Les études faites récemment de différents côtés au sujet de l'existence de très petits éléments animaux et végétaux de contagie me permettent de présenter ma série de recherches microscopiques sur la lymphe vaccinale.... Jusqu'aujourd'hui, aucun résultat positif n'a été donné par les découvertes, faites par plusieurs auteurs, de corps organisés dans le sang et dans les pustules des malades.... et récemment encore EISELT [XC] disait : « Il y a des humeurs contagieuses sans cellules, comme la lymphe vaccinale.... » La lymphe vaccinale examinée dans une goutte d'eau au microscope présente un certain nombre de cellules en forme de petits grains de 7 à 14 μ ($\frac{1}{300}$ à $\frac{1}{500}$ lin.) contenant des noyaux libres plus petits, de dimension 0,7 à 2,8 μ ($\frac{1}{800}$ à $\frac{1}{3.000}$ lin.) et des molécules punctiformes de grandeur presque impossible à mesurer. Ces formations organiques sont en quantité très variable dans la lymphe, mais ne manquent jamais. Ces cellules ont une très mince membrane presque imperceptible et un aspect spécial du contenu qui les différencie tout à fait du fin granulé des cellules de pus et de mucilage.... »

KEBER tient ces formations cellulaires pour le propre vecteur du virus vaccinal, mais il pose sans la résoudre la question de leur nature : débris du réseau de Malpighi modifiés par le milieu ou corps organisés vivants ?

Dans un deuxième article, HALLIER et ZURN [CXIII bis] déclarent avoir trouvé d'actifs microcoques et les spores d'un *Leptothrix* (*Mycothrix*). Donnant le résultat de ses cultures, HALLIER croit pouvoir assimiler ce microcoque de la vaccine à une Sporidie, puis à un *Cladosporium* ;

il hésite ensuite entre les genres *Sporidesmium*, *Tilletia*, *Monilia*, *Pleospora*, *Oidium*, *Eurotium*, *Aspergillus*, *Stemphylium*, *Ustilago*, *Torula* et encore d'autres champignons qu'il explique comme étant des formes de développement des microcoques du vaccin ¹. Il signale que par aspiration de ces cultures, il prit un catarrhe bronchique avec expectoration de ces mêmes microcoques.

En 1872, COHN (*Virchow's Archiv*) [LXIII] revient sur ces recherches : « J'ai pu constater avec certitude dans la lymphe de vaccine et de variole certaines différenciations de forme microscopique ou de développement. La préparation de lymphe fraîche se montre, ainsi qu'il a été observé déjà, ordinairement riche et presque remplie de corps en boule qui, ordinairement petits, sont privés de mouvements propres, mais présentent un mouvement moléculaire et ne paraissent pas différer beaucoup, par leur pouvoir réfringent, du sérum. En réalité, ils ne peuvent être vus, par ceux qui n'y sont pas habitués (comme par exemple pour les systèmes de stries de *Pleurosigma*), qu'avec l'immersion et un bon éclairage.

« Leur grosseur ne peut être mesurée facilement avec un micromètre ; elle est souvent plus petite que 1μ , mais il se trouve aussi dans la lymphe de nombreux corpuscules plus gros, très réfringents, dont ils se laissent difficilement différencier, qui seraient comme des formes de résistance ou des figures de développement

1. Cette hypothèse est à rapprocher des curieuses théories de cet auteur au sujet des transformations des champignons. A ce sujet, voir Ant. MAGNIN [CXXXIX], et l'historique de la thèse de BEAUVERIE [IX].

des plus petits. Je les tiens pour des cellules dont la membrane se présente comme un anneau clair et entoure un contenu qui paraît plus noirâtre.

« Examinés peu après la préparation, ils sont ordinairement simples, plus rarement disposés par paire en 8; mais déjà après un temps assez court, le nombre des doubles cellules augmente; bientôt on voit des séries ou chaînes de quatre éléments appendus les uns aux autres...; apparemment, ces anneaux ne sont pas fortement unis, mais se touchent de très près. »

COHN considère ces corpuscules de la lymphe vaccinale comme étant des Schizomycètes qui se reproduisent sans formation mycélienne, par simple division cellulaire et peut-être aussi par formation de cellules durables. Il propose le nom de *Microsphæra*.

Pendant plusieurs années, les recherches sont faites du côté bactéries ou protozoaires, et ce n'est qu'en 1888 que paraît l'important travail de L. PFEIFFER [CL], qui a pour titre : *Die bisherigen Versuche zur Reinzuchtung des Vaccine Contagiums und die Antiseptik der Kuhpockenimpfung* ¹.

L'auteur, après un historique complet, énumère les diverses formes bactériennes trouvées dans la lymphe, puis il donne la première description détaillée du champignon qu'il nomme *Saccharomyces vaccinæ*, groupant sous ce nom plusieurs espèces de levures que, seules, des cultures pures pouvaient caractériser. Voici cet article, seule étude des levures du vaccin qui ait été

1. En 1887, TENHOLT [CLXVIII] avait cité deux levures dans la lymphe vaccinale sans en donner de description.

publiée jusqu'ici, à notre connaissance, et non encore traduite en français :

« Le *Saccharomyces vaccinæ* se caractérise par de petites cellules rondes ou ellipsoïdes, isolées ou réunies en chaînes de 1,5 à 4,5 μ , le plus souvent présentant une vacuole au centre et un noyau brillant situé par côté.

« La formation de bourgeons est abondante sur milieu de culture frais sans formations mycéliennes, sans sporulation à l'intérieur.

« Sur moût de bière, il ne produit pas d'alcool, ou seulement une très faible quantité.

« La différenciation des six à sept formes voisines reste encore à débrouiller par les botanistes. Elles ont été vues la première fois par Hallier, en 1868, dans la lymphe de veau. La lymphe d'enfant recueillie avec des soins d'asepsie contient rarement des formes de *Saccharomyces* ; par contre, la découverte de levures est constante dans la lymphe de veau ; suivant la saison, c'est une forme ou l'autre qui entre en premier plan.

« La méthode de recherches est celle qui est employée partout. Par addition d'extrait de malt à la gélatine nutritive, on favorise beaucoup la croissance des levures.

« Sur plaque, la levure pousse à la température de la chambre ; en l'espace de quatorze jours, elle atteint la dimension d'environ une tête d'épingle ; c'est un point jaunâtre ou vert qui se présente au grossissement d'environ cent diamètres, avec une couleur brun foncé ou noire, épais et également grenu, avec un pourtour net-

tement tranché, denté, un liseré verdâtre. Il n'y a pas de liquéfaction de la gélatine environnante.

« Lorsque la gélatine en tube est ensemencée avec le produit des cultures sur plaques, le canal de piqûre se trouble après quelques jours; il devient laiteux et, dans le temps de deux à trois semaines, la surface du contenu est recouverte d'une couche épaisse d'un blanc éclatant, parfois rouge; ensuite le développement est lent, les cellules meurent; c'est seulement s'il se produit une souillure que la liquéfaction du contenu commence.

« Sur tranches de carotte, les formes de *Saccharomyces* prennent un aspect de petites colonies en bouton et la croissance devient, en l'espace de quelques jours, très active. De même en solution sucrée légèrement additionnée d'extrait de viande et de moût de bière, le bourgeonnement se produit rapidement. Dans les deux derniers liquides, on ne trouve, à 35° C., qu'un très faible dégagement de CO_2 ; le plus souvent, il n'y a pas formation de ce gaz.

« Une formation mycélienne fut une fois observée dans une culture en goutte suspendue. Il ne se forme pas de peau comme pour le *Saccharomyces mycoderma*.

« En moût de bière et en solution sucrée, toutes les cultures ont donné, par bourgeonnement actif, une forme plus ellipsoïde. La plupart des cellules développées présentaient une vacuole placée plus au centre, et un noyau très clair, brillant, placé à côté. Les cellules filles très jeunes, encore unies à la cellule mère, ont aussi la vacuole et le noyau.

« La coloration avec la fuchsine altère les contours tout à fait gravement; la dimension des plus grosses

formes est jusqu'à $0,5\ \mu$ plus petite que chez les exemplaires vivants. »

Après avoir rapproché ces formes des *Torula* décrites par PASTEUR et HANSEN, l'auteur insiste, à la fin du chapitre consacré aux Blastomycètes, sur l'utilité de la connaissance exacte de ces levures au point de vue d'une confusion possible avec les formes embryonnaires du parasite nouvellement trouvé dans la vaccine, formes qui ont une certaine ressemblance, à leur état jeune, avec les cellules de levures.

Il faut signaler aussi, à cette même époque, le travail de BUIST [XLII]. Cet auteur, ayant découvert à peu près constamment des formes de levures dans la lymphe d'enfant devenue trouble, entreprit de longues recherches d'inoculation, spécialement sur les singes. Malheureusement, au lieu de séparer par des cultures ces champignons, il employa par analogie des levures ordinaires: Nous reviendrons plus loin sur ces recherches quand nous étudierons les relations des levures du vaccin avec la question du contage vaccinal; en tout cas, BUIST ne donne aucune description des formes qu'il annonce avoir observées.

Enfin, une phrase du professeur KIRCHNER (de Hanovre), dans un article sur le contenu microbien de la lymphe animale [CXXV], mentionne la présence de levures: « Comme pour les autres chercheurs, il m'est arrivé de trouver avec la plus grande fréquence des moisissures et des levures; parmi les premières, les plus fréquentes étaient: *Penicillium glaucum*, *Mucor mucedo*, *Aspergillus niger*; les dernières étaient presque sans exception des levures incolores. »

En 1897, dans un nouvel article général consacré à la question du contagement du vaccin, L. PFEIFFER passe en revue les travaux parus sur ce sujet depuis 1887 [CLI]. Dans le paragraphe consacré aux Blastomycètes ou moisissures comme porteurs de contagement, l'auteur résume les recherches de BUIST dont il critique les conclusions. Il termine en faisant remarquer que l'intérêt de l'étude des levures contenues dans le vaccin est encore rendu plus grand depuis les travaux de BUSSE, SAN FELICE et RONCALE, tout en faisant cette réserve que les organismes « où nous voyons aujourd'hui des Blastomycètes, ne soient que des formes conidiennes de moisissures pathogènes. »

CHAPITRE II

ORIGINE DES VACCINS ÉTUDIÉS ET MÉTHODES D'OBSERVATION

Nos recherches ont porté surtout sur le vaccin fourni pendant deux mois par l'Institut vaccinogène municipal de Lyon. Par comparaison, nous avons examiné aussi quelques culturesensemencées sur milieux favorables au développement des levures avec d'autres vaccins, en général âgés de plusieurs mois (voir p. 78).

Le vaccin lyonnais est recueilli de la manière suivante : l'inoculation au veau ou à la génisse se fait par scarifications pratiquées sur le flanc de l'animal avec le vaccinogriffe du docteur Isembert, le bistouri à trois lames, ou, par dénudation de l'épiderme au moyen du papier verré.

Le passage sur le veau dure cinq jours pleins. Un lavage à l'eau stérilisée est fait sur la région de pustulation, puis le produit est récolté à la curette ; immédiatement on ajoute son poids d'un mélange d'eau et de glycérine neutre stérilisée.

Ce vaccin est laissé à la glacière pendant un certain nombre de jours suivant les besoins. Après une macération d'au moins huit jours, il est broyé dans un mor-

lier et passé à travers une toile métallique fine ¹ ; ce produit en pulpe est conservé à la glacière dans des pots contenant de 70 à 120 grammes de pulpe brute, jusqu'à utilisation. Au bout de dix à douze jours, le vaccin est essayé sur lapin (inoculation après avoir rasé la peau de la région dorsale) et sur enfant, puis il est mis en tubes pour la distribution, si les résultats sont favorables.

Nous avons opéré sur cette pulpe, soit fraîche, soit glycérinée et broyée. Des ensemencements étaient faits en strie sur gélose maltosée, au moyen de frottis sur pomme de terre en tube de Roux, sans capuchon de caoutchouc. A la température du laboratoire (18-20°) et à l'obscurité, au bout de trois à quatre jours, parfois deux, se développaient des colonies de levures blanc grisâtre, arrondies, mesurant en général 1/2, 1 ou 2 millimètres de diamètre, souvent assez difficiles à distinguer des colonies de *Cocci*, de coloration blanc jaune, qui presque toujours poussaient en même temps. Cependant, certaines de ces colonies d'un blanc laiteux (aspect présenté fréquemment par la forme *Torula*) se distinguaient nettement des colonies bactériennes. Sur pomme de terre, où la croissance était souvent moins rapide que sur gélose maltosée, les colonies placées au sommet de la tranche, c'est-à-dire à l'endroit le plus sec, prenaient après quelques jours une apparence crayeuse bien caractéristique. L'examen microscopique ayant montré la présence d'éléments plus ou moins arrondis, un fragment de colonie, si possible bien séparée et distincte des autres amas de microbes, était porté sur

1. L'Institut vaccino-gène dispose aussi d'un broyeur mécanique; le transfert prochain dans d'autres locaux en a fait différer l'installation.

tranche de carotte en tube de Roux; sur cet excellent milieu, la plupart des levures que nous avons rencontrées dans le vaccin se développaient activement. Plusieurs fois nous avons aussi repiqué ces champignons sur agar au jus de carotte, préparé suivant les indications de A. ROCHAIX [CLX]; ce milieu nous a semblé également très favorable. Cette manière de procéder nous a donné plusieurs fois des cultures pures composées d'une seule espèce de levure, mais souvent les levures étaient mélangées; parfois elles étaient souillées de bactéries : *cocci* surtout et bacilles.

La purification d'une levure mêlée à des bactéries est relativement facile, et souvent le simple passage dans des milieux peu favorables au développement des autres microbes, comme, par exemple, le liquide de Raulin ou le bouillon légèrement acidulé, permet d'obtenir une culture pure. Il n'en est pas de même de l'isolement d'une levure mélangée à une levure qui peut être une espèce très voisine, et, pour l'obtenir, plusieurs méthodes ont été préconisées; on peut les diviser en deux groupes : méthodes physiologiques et méthode de dilution ou des cultures fractionnées. Nous renvoyons, pour cette question, au livre de M. GUILLIERMOND [CXI] qui expose très en détail ces divers procédés; disons seulement que, dans certains cas, des simplifications peuvent être apportées. C'est ainsi que nous avons pu isoler une espèce par le moyen suivant : la pointe du fil de platine, portant une très petite quantité de mélange de levures, est introduite dans un ballon d'eau stérilisée. Après avoir agité pour répartir le plus uniformément possible les cellules, on examine une goutte au microscope. Lors-

que dans une goutte on a trouvé une seule cellule ou deux ou trois cellules seulement, on fait une strie sur un milieu maltosé en boîte de Pétri.

Lorsque les colonies se développent, on peut, la plupart du temps, observer une différence macroscopique et repiquer une levure pure.

Technique employée pour l'étude botanique

Une fois la levure isolée, il faut procéder à l'étude botanique. Celle-ci comprend plusieurs séries de recherches :

I. *Aspect microscopique* des cellules sur milieux solides et liquides. Pour obtenir des données suffisantes sur la variabilité de l'organisme examiné, cette étude doit être faite sur de nombreux milieux.

II. *Aspect macroscopique* : le développement des colonies de levure sur des milieux solides offrant une large surface (comme, par exemple, la gélose maltosée en flacons plats) donne fréquemment des allures très caractéristiques. De même, l'aspect des cultures sur les liquides contenus dans des fioles d'Erlenmeyer, la formation de voiles, d'anneaux ou de dépôts, sont des caractères importants. Suivant les indications données par MM. LUTZ et GUEGUEN dans les *Actes du Congrès international de botanique* de 1900 [CXXXV], nous avons étudié les caractères des cultures de levures sur les milieux suivants :

1° *Milieux généraux* :

Liquide de Raulin acide normal ;

— neutre ;

— acide normal gélatiné :

— neutre gélatiné.

2° *Milieu azoté avec azote organique :*

Liquide de Raulin neutre sans azotate d'ammoniaque
+ urée.

3° *Milieux renfermant diverses matières sucrées ou
alcools polyatomiques.*

4° *Milieu renfermant des hydrates de carbone.*

Quant à la cinquième division proposée par MM. Lutz et Guéguen sous le titre *Milieux divers*, nous la placerons au début : ces milieux, en effet, sont plus faciles à se procurer et donnent des formes très caractéristiques ; d'autre part, fréquemment les levures poussent assez mal dans le liquide de Raulin. Nous estimons que cette méthode est appelée à rendre moins de services que pour les Mucédinées, c'est pourquoi nous commencerons notre étude par certains milieux très usuels, tels que la carotte ou la pomme de terre ; ce sont d'ailleurs des cultures sur tranche de carotte qui nous ont fourni les échantillons dessinés dans les figures qui accompagnent ce travail. C'est sur eux aussi qu'ont porté les plus nombreuses mensurations d'éléments.

III. Vient ensuite l'étude des *Propriétés biologiques*.

Nous avons étudié les températures limites et optima, les aspects microscopiques et macroscopiques des voiles, leurs conditions de formation. Une troisième catégorie de recherches porte sur les fermentations, l'action vis-à-vis des solutions sucrées. Cette étude a été faite suivant le procédé indiqué par LINDNER, en chambre humide. Nous avons employé les chambres humides de Van Tieghem et Le Monnier : une petite quantité de sucre bien pulvérisé est déposée sur la lame à l'intérieur de l'anneau ; de l'eau de levure stérilisée versée dans la

chambre est ensemencée avec la levure à étudier. On recouvre d'un couvre-objet en prenant garde de ne pas emprisonner de bulles d'air et le tout est mis à l'étuve à 25°. Après vingt ou vingt-quatre heures, s'il y a eu fermentation, de grosses bulles sont collées au couvre-objet qui peut même être soulevé et détaché de la vaseline qui le maintenait sur l'anneau de verre.

Les très importants caractères de sporulation n'ont pas pu être étudiés, les quatre levures isolées de la lymphé vaccinale n'ayant produit de spores sur aucun milieu.

IV. Ajoutons que pour acquérir une certitude sur l'aspect de formations que la différence de réfringence rendait très visibles lors de l'examen de la cellule vivante en goutte d'eau, nous avons eu recours à la coloration d'éléments fixés. La fixation ayant été faite à la chaleur, ou par l'alcool, une goutte de bleu Unna est déposée sur la lamelle où le contenu de l'anse de platine a été fixé. Après une dizaine de minutes on fait la décoloration avec la *Glycerinæthermischung* de Grübler, on passe dans la série des alcools pour déshydrater, dans le xylol et on monte au baume du Canada si l'on veut conserver la préparation ; enfin l'on examine au microscope. Ce mode de préparation a permis de rapporter à des corpuscules métachromatiques les granules réfringents dont nous parlons plus haut et qui ont été d'ailleurs bien signalés par plusieurs auteurs et spécialement GUILLIERMOND [CX]. Lorsque ces granules ne présentent pas la coloration rouge métachromatique, on peut, avec beaucoup de vraisemblance, les considérer comme des globules huileux, tels qu'il s'en produit souvent dans les vieilles cultures

ou dans les cultures en voie de dégénérescence ; d'ailleurs, l'action de l'acide osmique ou de la teinture d'orcanelle permettrait d'obtenir une certitude à ce sujet.

Nous insisterons sur un ou deux points qui nous ont paru plus spécialement dignes d'être notés.

D'abord, au sujet de l'examen microscopique, beaucoup d'auteurs établissent les caractères de forme et de dimensions des levures qu'ils étudient avec des préparations fixées par la chaleur ; ce procédé brutal a le grave inconvénient de déformer les cellules et surtout de réduire leurs dimensions à tel point que l'on peut considérer les chiffres donnés comme absolument inexacts. Des comparaisons de mesures faites sur des éléments fixés et non fixés par la chaleur nous ont permis de nous rendre compte de ces faits. Il faut, lorsqu'on veut procéder à des mensurations, monter les éléments à étudier dans l'eau, et, lorsqu'il s'agit d'une culture en milieu liquide, dans le liquide même servant de substratum. Cela n'empêchera pas, naturellement, de procéder à des fixations diverses, même par la chaleur, pour faire ensuite des colorations dans le but de distinguer les divers éléments qui entrent dans la constitution de la cellule.

Une autre observation, d'un intérêt plus général, est celle de l'utilité qu'il y a à se servir de la méthode Lutz et Guéguen pour la détermination. Lorsque, en effet, on cherche à identifier une levure, on éprouve une certaine difficulté à coordonner les renseignements fournis par les recherches déjà faites ; un procédé uniforme peut seul faciliter ce travail, étant donné les nombreuses propriétés de ces champignons qu'il faut étudier

pour pouvoir les caractériser suffisamment au point de vue spécifique. Remarquons cependant que le liquide de Raulin, si favorable au développement du *Sterigmatocystis* et, d'une façon générale, de toutes les Mucédinées, paraît moins convenable pour les levures.

DEUXIÈME PARTIE

DESCRIPTION DES LEVURES



CHAPITRE PREMIER

LA LEVURE *TORULA I* DU VACCIN

Origine

Provient de la lymphe du veau n° 5 inoculé avec un vaccin d'origine parisienne. La première espèce isolée a été obtenue par culture sur gélose maltosée de pulpe glycinée. Cette pulpe, récoltée le 3 février 1913, futensemencée le 19, après 16 jours de contact avec la glycinée.

Elle a été retrouvée ensuite dans plusieurs pulpes, soit glycinées, soit non glycinées : voir le tableau, p. 77.

Caractères morphologiques

I. — CARACTÈRES MICROSCOPIQUES, FORMES ET DIMENSIONS

Une culture sur carotte, âgée de 3 jours, à la température du laboratoire (17-20°), montre des cellules arrondies, souvent sphériques, mesurant en général de

2,5 à 4 μ de diamètre. Plus âgées (5 jours), elles sont un peu plus grandes et peuvent atteindre 4,5 à 5 μ de diamètre. A l'intérieur, on observe en général une grosse

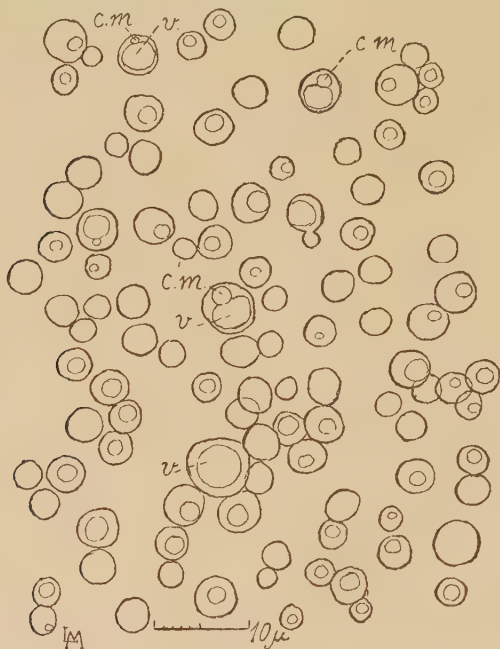


FIG. 1. — *Levure Torula I du vaccin.*

Culture sur carotte, âgée de 4 jours à 18°; — v, vacuoles; — c. m., corpuscules métachromatiques.

Dessin à la chambre claire avec l'appareil à dessiner de Zeiss; ocul. 4; obj. apochr. 1,5 Zeiss. — Dessin non réduit.

vacuole qui se reconnaît bien à son aspect plus mat et à la différence de réfringence. En modifiant très légèrement la mise au point, on aperçoit, visible parfois en même temps que la vacuole, un granulé assez gros, très réfringent. Quelques rares cellules présentent deux ou trois de

ces granules. La coloration par le bleu de Unna a montré que ces granules étaient des corpuscules métachromatiques. Sur la préparation colorée, on en distinguait surtout dans la vacuole, mais, souvent aussi, un corpuscule légèrement plus volumineux que les autres se trouvait dans le cytoplasma bordant la vacuole, expliquant ainsi l'aspect que nous avons représenté dans la figure 1, désigné par les lettres *v.* et *c. m.*

Le grand nombre des mensurations que nous avons opérées nous a permis d'établir le polygone de fluctuation de la taille des éléments, suivant la méthode statistique proposée par J. Beauverie [X].

Diamètres	1,5	2	3	4	5	6
Fréquences	0,70 %	1,46 %	34,5 %	40,4 %	8,8 %	1 %

Voir la courbe page 58.

Modifications suivant la nature des milieux

a) Milieux solides :

Carotte à 18°. — Culture âgée de 3 jours; cellules sphériques avec grosse vacuole : 2,5 à 5 μ de diamètre; examinée de nouveau après une quarantaine de jours, la culture présente les mêmes formes cellulaires; la vacuole est nettement visible.

Pomme de terre 18°. — Culture âgée de 8 jours; éléments sphériques, nombreuses formes bourgeonnantes; dimensions = 2 à 5 μ . Après 1 mois: formes sphériques, nombreuses grosses cellules atteignant 6-7 μ , vacuole bien nette. On observe d'assez nombreux bourgeonnements; parfois plusieurs petites cellules filles

(2 ou 3) sont réunies à une même cellule mère. Le 45^e jour, les cellules de petit diamètre sont les plus fréquentes; celles mesurant 6 à 7 μ sont rares; quelques éléments sont déformés.

Gélose maltosée. — Examen après 15 jours à 18° : éléments sphériques avec grosse vacuole très nette; très rarement on trouve de grosses cellules dont le diamètre est de 6 μ ; la plupart ont 2,5 à 4,5 et 5 μ .

Gélose jus de carotte. — Sur ce milieu, les cellules de cette *Torula* atteignent souvent 5 μ , celles de 4 et 4,5 μ sont fréquentes; rarement leur diamètre mesure moins de 3 μ (examen après 10 jours à la température du laboratoire); même aspect après 53 jours, nombreux bourgeonnements.

Albumine d'œuf de poule. — 4 jours : cellules plutôt petites, assez gros globules, plusieurs bourgeonnent; on remarque des groupements de trois ou quatre cellules bien plus fréquemment que dans les autres cultures. Dimensions = 2 à 4 μ .

Raulin gélatiné acide. — 6 jours : éléments sphériques, vacuole peu nette. Mensuration = 5 μ , 4 μ le plus souvent, 3,5 μ . Après un mois, l'examen microscopique montre des cellules de même dimension, mais quelques-unes sont groupées en chaînettes de 2 ou 3; d'autres présentent une membrane légèrement épaissie.

Raulin gélatiné neutre. — 5 jours : cellules sphériques, quelques éléments bourgeonnent. Dimensions comme pour le précédent milieu = 3,5 μ , 4 μ , 5 μ . L'aspect des cellules est le même après un mois et demi; à signaler seulement l'épaississement de la membrane chez quelques éléments.

Liquide de Raulin (solution mère) + amidon de riz.
— A titre d'indication, nous donnons les caractères microscopiques de la *Torula* I sur ce milieu, utilisé dans l'étude des réactions biochimiques des levures (cf. caract. macroscopiques). Les cellules y végètent sous forme d'éléments sphériques dont plusieurs bourgeonnent.

b) Milieux liquides :

Lait. — 16 jours après l'ensemencement : cellules sphériques, bourgeonnement rare ; le plus grand nombre mesure 2,5 à 4 μ ; quelques-unes atteignent 5,5 à 6 μ ; quelques cellules semblent montrer une tendance à l'allongement.

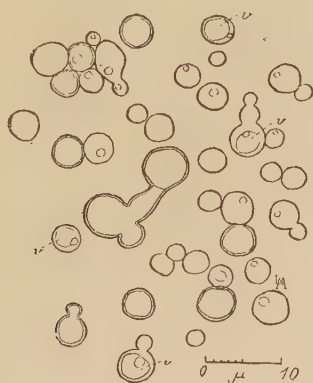


FIG. 2. — *Levure Torula* I du vaccin.

Culture sur moût de bière (fragment d'anneau), âgée de 20 jours. — Éléments à membrane épaissie ; la vacuole (v) a été représentée dans plusieurs cellules.

Dessinée à la chambre claire ; ocul. 4 ; obj. apochr. 1,5 Zeiss. — Dessin réduit d'environ 1/3.

Moût de bière. — Examinée au bout de 6 jours, la levure *Torula* I montre des cellules d'assez grande taille

(5 et 4 μ fréquentes, extrêmes 2 et 6 μ). Après 20 jours, on observe des formes de petite taille plus nombreuses et des formes de dégénérescence (cf. fig. 2). Mensuration après 20 jours : 3 μ , 3,5 et 4 μ .

Jus de carotte. — 26 jours : Éléments sphériques, grosse vacuole nette; quelques formes de grande taille avec très grosse vacuole occupant presque toute la cellule et refoulant le granule contre la membrane. Dimensions : 2,5 à 5 μ .

Liquide de Raulin acide normal. — Cellules de petite taille, vacuole très peu nette, plusieurs bourgeonnent; 2 à 4 μ de diamètre (examen après 8 jours). Après un mois, les éléments dont le diamètre varie de 3 à 5 μ présentent une forme ovoïde allongée; certains mesurent 5 μ de long sur 3,5 à 4,5 de large.

Liquide de Raulin neutre. — Même aspect microscopique que sur Raulin acide; dimensions encore plus petites : 2 à 3,5 μ .

Liquide de Raulin avec urée. — 5 jours à 18° : petits éléments sphériques, quelques-uns bourgeonnent; 2,5 à 4 μ , le plus souvent 3 et 3,5 μ .

Liquides de Raulin sucrés :

Avec glucose. — Examen après 12 jours : les cellules, qui sont peu nombreuses dans ce liquide où la levure paraît pousser assez mal, sont sphériques et présentent souvent des formes bourgeonnantes. Mensuration : 2,5 à 3,5 μ .

Avec lactose. — 12 jours : forme sphérique en général, quelques cellules sont subovalaires; membrane épaisse souvent très visible; plusieurs bourgeonnent; 2,5 à 4 μ .

Avec maltose. — Sphériques, de petite taille, bourgeonnement très fréquent. 2-2,5-3 μ .

Avec glycérine. — Nombreuses formes bourgeonnantes, taille un peu plus grande que les précédentes : 3-3,5-4,5 μ .

Bouillon de bœuf. — Forme sphérique, vacuole peu nette ou invisible ; 2,5 à 3,5 μ . (Examen après 5 jours.)

II. — CARACTÈRES MACROSCOPIQUES DES CULTURES

a) Milieux solides :

Carotte à 18°. — Enduit blanc brillant assez mince, à bords déchiquetés. Débute vers 48 heures ; au bout de 4 jours, il est bien développé.

Pomme de terre. — Au bout de 48 heures, on observe un début d'enduit formé par confluence de colonies rondes assez larges (1 à 2 mm.) qui donnent des stries moniliformes. Après quelques jours, cet enduit blanc devient grisâtre, légèrement rosé et mamelonné.

Gélose maltosée. — Sur la strie d'ensemencement se développent assez rapidement (trentaine d'heures à 18°) de petites colonies blanches en tête d'épingle ; elles confluent en un enduit blanc, à bords finement dentés, qui s'étale par la suite.

Gélose jus de carotte. — En 24 heures, début de petites colonies blanches qui se réunissent le 3^e et le 4^e jour en un enduit assez épais, légèrement grisâtre, à bords arrondis.

Albumine d'œuf de poule. — Sur la strie d'ensemencement se développe assez rapidement par places un léger enduit blanchâtre, mais il reste stationnaire

et bientôt ne s'accroît plus. (Examen après 3, 10, 45 jours.)

Raulin gélatiné acide. — Sur l'emplacement de la strie se développe un enduit blanc mince, à aspect sec, bords légèrement lobés arrondis. (Début du développement après 4-5 jours.)

Raulin gélatiné neutre. — Très léger enduit blanc, à bords finement découpés, poussant très lentement. L'apparition de cet enduit est encore plus tardive que sur le Raulin acide gélatiné.

Raulin + amidon de riz. — Pas de liquéfaction.

Gélatine (ensemencement en piquâre). — Développement en clou d'une colonie blanche épaisse ; la pointe largement étalée présente des bords lobés ; pas de liquéfaction.

Culture géante (méthode de Lindner). — Colonie largement étalée, d'un beau blanc ; développement égal ; bords très finement lobés, grisâtres.

b) Milieux liquides :

Moût de bière. — Après 40 heures à 25°, trouble sur une épaisseur d'environ 1 cm. à partir de la surface du liquide ; parcelles de voile adhérentes aux parois ; après 3 jours, des taches ressemblant à de la matière grasse flottent ; au bout de 4 jours et demi à 5 jours apparaît un très mince voile gris formé de petites pellicules arrondies et séparées. Un anneau est nettement visible sur les parois du tube ; il y a eu formation d'un dépôt au fond du récipient. Examinée après un mois, la culture présente un voile assez épais, jaune grisâtre, et un anneau très net ; le liquide est trouble et un dépôt assez abondant occupe le fond du tube à essai.

Jus de carotte. — Un voile blanchâtre se forme assez lentement ; après 29 jours, il est assez épais, de coloration blanche présentant assez bien l'aspect d'une fausse membrane diphthérique ; il y a un anneau sur les parois du tube et le liquide est trouble.

Liquide de Raulin acide normal. — Au bout de 5 jours, à température ordinaire, la culture en flacons d'Erlenmeyer présente un dépôt léger disposé en traînées rayonnantes ; pas de voile ni d'anneau. Après 7 jours, on observe un voile mince grisâtre discontinu ; les parcelles de ce voile situées sur le pourtour forment un léger anneau qui adhère aux parois. Après 45 jours, il n'y a pas de changement.

Liquide de Raulin neutre. — Voile grisâtre, se formant le 6^e ou 7^e jour, peu épais ; mince anneau sur les parois, dépôt pulvérulent.

Liquide de Raulin avec urée. — 7 jours : voile gris, mince, avec grumeaux ; l'anneau sur les parois est plus épais que dans les milieux précédents.

Liquides de Raulin sucrés :

Avec glucose. — Un léger anneau apparaît au bout de 6 à 7 jours ; examiné après 11 jours, cet anneau est plus net ; le 19^e jour, l'anneau gris peu épais est continu, quelques parcelles de culture grisâtres flottent à la surface ; après 1 mois, on constate la présence d'un très mince voile formé de petites taches arrondies de couleur grise, confluentes.

Avec lactose. — Un anneau se forme dès le 4^e jour sur les parois du récipient ; le 6^e jour, on obtient un léger voile grisâtre déchiqueté ; ce voile reste toujours mince et garde l'aspect discontinu remarqué à son apparition.

Avec maltose. — La formation du voile est plus rapide que dans les autres liquides de Raulin additionnés de sucre. Le 4^e jour, des parcelles de culture grise flottent sur le milieu, et le lendemain, un voile réticulé gris occupe presque toute la surface du liquide ; un anneau de même coloration se forme rapidement sur les parois. L'examen macroscopique au 45^e jour montre un voile réticulé extrêmement mince et délicat.

Avec glycérine. — Après 90 heures, on peut observer un très léger anneau sur les parois ; le voile n'apparaît que vers le 9^e jour. Au bout de 20 jours, l'anneau s'est épaissi davantage que dans les autres Raulin sucrés ; le voile gris, réticulé, ressemble à celui qui se produit sur Raulin maltosé ; il est également très peu épais.

Bouillon de bœuf. — Ni voile ni anneau. La levure pousse en dépôt au fond de la fiole d'Erlenmeyer ; quelques stries grises et quelques grumeaux nagent dans le liquide.

Propriétés biologiques

I. TEMPÉRATURE. — A $+ 14^{\circ}$, cette levure pousse bien ; le degré le plus favorable semble être entre $+ 20^{\circ}$ et $+ 25^{\circ}$. A 37° , cette espèce végète et donne un bel enduit blanc en 3 ou 4 jours ; à 45° , elle ne pousse plus ; à $- 5^{\circ}\text{C.}$, la levure semble encore vivante, avec des formes de résistance à membrane épaissie, mais elle végète très mal.

II. SPORULATION. — Sur bloc de plâtre, le premier examen, après 19 heures, montre des formes normales bien développées, sans spores ; il en est de même pour les observations faites après 2, 3, 5 et 8 jours. Nous

avons aussi essayé d'obtenir la sporulation en utilisant le procédé Gorodkowa, mais nous n'avons pas trouvé de sporulation après 19 heures, 43 heures, 3, 4 et 7 jours, etc.

Sur aucun milieu nous n'avons pu constater la présence d'endospores.

III. VOILES. — *Moût de bière* : 5 jours, début de voile ; après un mois, voile assez épais, jaune grisâtre ; anneau ; liquide trouble ; dépôt.

Jus de carotte. — Voile blanchâtre ; anneau ; liquide trouble. Le voile se forme assez lentement ; après un mois, il est épais de 2-3 millimètres et présente l'aspect d'une fausse membrane diphtérique.

Liquide de Raulin acide. — Voile et anneau très minces, grisâtres.

Liquide de Raulin neutre. — Voile et anneau très minces ; dépôt assez abondant.

Liquide de Raulin avec urée. — Voile mince, anneau assez épais.

Liquides de Raulin sucrés :

Avec glucose. — Anneau, pas de voile.

Avec lactose. — Voile et anneau peu épais.

Avec maltose — Voile et anneau.

Avec glycérine. — Voile mince apparaissant tardivement, anneau épais.

IV. FERMENTATIONS. — L'action des levures sur les solutions sucrées a été observée par le procédé de Lindner. La fermentation était nette dans la solution de lévulose ; dans les autres chambres humides, aucune fermentation n'a été observée avec les solutions de glucose, lactose, maltose et saccharose. Ce premier

examen avait été fait au bout de 24 heures. Les chambres humides ayant été remises dans l'étuve à 25°, des bulles se sont manifestées dans la solution de maltose, au bout de 40 heures environ ; étant donné le petit nombre de ces bulles et leur apparition tardive, la fermentation semble être douteuse avec ce sucre.

V. AFFINITÉS. — L'allure microscopique des cellules de cette levure, l'absence de sporulation, l'aspect des voiles, permettent de rapprocher cette espèce des *Torula* de Hansen. Nous avons cherché à l'identifier, mais aucune des espèces dont nous avons trouvé une description suffisante n'a pu se rapporter à celle-ci.

VI. ACTION PATHOGÈNE. — L'inoculation au cobaye, par injection sous-cutanée et par scarification vulvaire, celle faite au lapin dans le sang circulant, ont été négatives.

Nous revenons plus loin, au moment où nous étudions le rôle des levures du vaccin, sur les méthodes qui ont été employées dans ce travail pour la recherche du pouvoir pathogène des levures.

CHAPITRE II

LEVURE *TORULA II* DU VACCIN

Origine

Provient de la pulpe recueillie après inoculation au veau n° 7 d'un vaccin marseillais. Elle a été isolée d'une colonie de levure développée sur tranche de pomme de terreensemencée avec la pulpe fraîche, récoltée le jour même, non encore glycélinée.

Nous l'avons rencontrée dans plusieurs autres échantillons, moins fréquemment toutefois que l'espèce précédente. Voir, à ce sujet, le tableau de la page 77.

Caractères morphologiques

I. — CARACTÈRES MICROSCOPIQUES, FORMES ET DIMENSIONS

Les cellules de cette espèce sont de forme un peu variable : la plupart sont ovalaires, mais de nombreux éléments sont presque ou tout à fait sphériques. Dans toutes, le cytoplasme est uniformément granuleux et présente une teinte jaunâtre.

Les dimensions sont plus grandes que celles de la forme précédemment décrite. Le diamètre des formes sphériques appartenant à une culture sur carotte âgée de

5 jours (à température du laboratoire) varie de 4 à 6 μ ; pour le plus grand nombre, il atteint 5 μ à 5,5 μ . Certaines cellules sont allongées et la différence des diamètres est, en général, chez celles-ci, de 0,5 à 1 μ . La plupart de ces dernières nous ont donné à la mensuration : $D = 5 \mu \times d = 4,5$ ou 6×5 , et plus rarement $6 \times 4,5$.

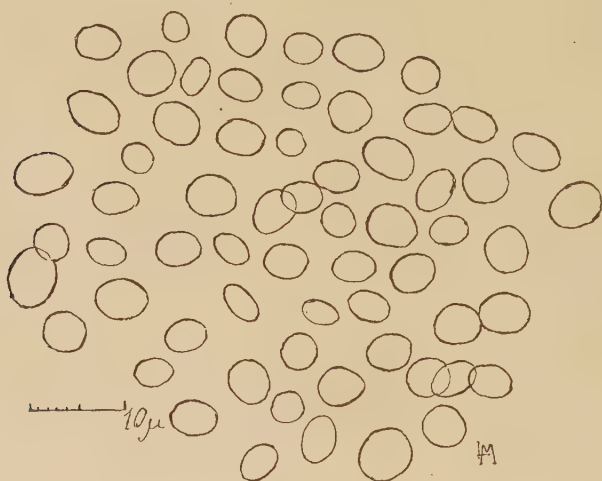


FIG. 3. — *Levure Torula II du vaccin.*

Culture sur tranche de carotte, âgée de 5 jours.

Dessin à la chambre claire ; ocul. 4 ; obj. apochr. 1,5 ; non réduit.

Comme pour la forme *Torula I* du vaccin, nous avons établi le polygone de fluctuation de la taille des éléments :

Diamètres (en μ)	4	5	6	7
Fréquences :	25,4 %	34,5 %	21,8 %	1,8 %

Voir la courbe, p. 58.

Modifications suivant la nature des milieux

a) Milieux solides :

Carotte à 18°. — Culture de 5 jours : éléments sphériques et ovalaires; peu de cellules allongées; dimensions : 4 à 6 μ , le plus souvent 5.

Pomme de terre. — Les cellules sont sphériques, mais il y a aussi des éléments ovoïdes; leur contenu, plus réfringent, est moins visible que dans les cultures sur carotte. Examinée au bout de 4 jours, elle donne les dimensions suivantes : diamètre = 3,5 à 5 μ ; après 6 jours, 4,5 et 6 μ . Les cellules sphériques semblent être de beaucoup les plus nombreuses. Au 22^e jour, les mêmes formes arrondies sont observées; chez quelques cellules, la membrane s'est épaissie et apparaît très nette. Après 45 jours, les éléments de forme sphérique mesurent de 4,5 à 6 μ de diamètre; la membrane est parfois très visible.

Gélose maltosée. — La culture est examinée au 7^e jour. Les formes ovales sont nombreuses. Le cytoplasme, nettement visible, présente assez souvent des granulations un peu plus volumineuses que les autres, de disposition irrégulière. Les mensurations nous ont donné les résultats suivants : diamètre = 4 à 5 μ . Pas de changements aux examens faits le 15^e, le 30^e et le 45^e jour.

Albumine d'œuf de poule. — 4 jours : Les cellules arrondies sont les plus nombreuses; leur cytoplasme est bien net. Le bourgeonnement est fréquent. Diamètre = de 3,5 à 6 μ . Après 10 jours, les éléments allongés

sont les plus nombreux ; leur cytoplasme montre d'assez gros granules réfringents. La longueur de certains éléments peut atteindre 7μ .

Raulin gélatiné acide. — 7 jours : Formes sphériques,



FIG. 4. — *Levure Torula II du vaccin.*

Culture sur liquide de Raulin acide gélatiné, âgée de 19 jours. Formes anormales avec tendance au gigantisme.

Dessin à la chambre claire ; ocul. 4 ; obj. apochr. 1,5 ; réduit d'environ $1/7$ à $1/8$.

rarement ovalaires. La membrane est souvent nette. Plusieurs cellules bourgeonnent. Dimensions : $3,5$ à 6μ . Au bout de 28 jours, on voit au microscope des cellules le plus souvent sphériques ; la membrane est fré-

quemment épaissie, le cytoplasme jaunâtre, granuleux. Après un mois, un nouvel examen montre l'existence de formes anormales avec tendance au gigantisme, comme Guilliermond et J. Beauverie l'ont observé dans certains cas. (Voir fig. 4.)

Raulin gélatiné neutre. — 7 jours : Les formes ovales sont un peu plus fréquentes que sur le milieu précédent, mais la grande majorité est toujours sphérique. Bourgeonnement rare. Le cytoplasme est très visible dans chaque cellule. Diamètre = $3\ \mu$ à $6,5\ \mu$. — 48 jours : éléments arrondis à cytoplasme transparent ; les dimensions sont les mêmes qu'aux examens précédents.

Gélose jus de carotte. — 7 jours : Cellules sphériques, forme ovale très rare. Fréquemment quelques granules réfringents assez gros se différencient du reste du cytoplasme.

Raulin avec amidon de riz. — Eléments sphériques, quelques-uns légèrement ovales. La membrane est visible. Parfois il existe 2 ou 3 granules très réfringents ; ils occupent les deux pôles de la plupart des cellules allongées.

b) Milieux liquides :

Lait. — La plupart des éléments sont sphériques, les cellules de forme ovale sont rares ; il y a de nombreux bourgeois et l'on rencontre des chaînes de plusieurs individus, en général 4 ou 5. Le diamètre varie de 3 à $6\ \mu$. (Examen après 13 jours.)

Jus de carotte. — Examinées après 19 jours, les cellules de cette levure sont de dimensions normales ($4,5\ \mu$;

les plus grandes 5,5); on ne rencontre pas de formes ovalaires.

Liquide de Raulin acide normal. — 12 jours : Cellules sphériques dont certaines atteignent 7 μ ; les plus nombreuses mesurent 5-6 μ de diamètre. Après 46 jours, on observe des formes qui mesurent 4 à 6 μ en général ; un certain nombre de cellules plus grosses atteignent 7 et 8 μ . Les bourgeonnements sont assez nombreux ; plusieurs cellules allongées s'étranglent en leur milieu et quelques-unes sont déformées d'une manière appréciable.

Liquide de Raulin neutre. — 12 jours : Une goutte de liquide de culture examinée au microscope ne montre que de rares éléments sphériques ; la levure paraît pousser très mal sur ce milieu. Après 24 jours, on observe des cellules rondes et ovalaires ; quelques-unes sont disposées en chaînes de 5 à 8 cellules. Le diamètre mesure en général 6 μ ; il atteint 8 μ dans deux ou trois grosses cellules situées au centre d'une chaîne.

Liquide de Raulin avec urée. — Des examens répétés ont été négatifs au 10^e comme au 40^e jour.

Liquides de Raulin sucrés :

Avec glucose. — Rien au bout de 12 jours à température ordinaire et à 25°.

Avec lactose. — Id.

Avec mallose. — Examinée après 13 jours, une goutte du liquide de culture montre 7 à 8 cellules isolées à membrane nette, sphériques, dont le diamètre varie de 4 à 6 μ . Après 17 jours, l'examen porte sur une parcelle de l'anneau qui s'est formé sur les parois du tube. Les cellules sont sphériques, souvent plus grandes que sur

les milieux précédemment étudiés; quelques-unes bourgeonnent; il y a de petites chaînes de 2 ou 3 individus. Dimensions: 4, 5 μ , 6 et 7 μ .

Liquide de Raulin glycérimé. — Ne pousse pas.

II. — CARACTÈRES MACROSCOPIQUES DES CULTURES

a) Milieux solides :

Carotte à 18°. — Enduit blanc grisâtre d'aspect visqueux, à contours arrondis assez épais. Lorsqu'on en prélève avec l'anse de platine, on entraîne une sorte de filament de consistance semi-liquide. Débutant au 3^e jour, il est bien développé 4 ou 5 jours après l'ensemencement.

Pomme de terre (à température du laboratoire). — Au bout de 2 jours, début d'enduit blanc; devient abondant le 3^e jour et prend un aspect mamelonné. Après 26 jours, l'enduit blanc en large plaque présente à sa surface de petites élévations très courtes, assez espacées les unes des autres, donnant un aspect spécial, chagriné; les bords sont lobés, arrondis. La coloration devient grisâtre, d'aspect blanc sale.

Gélose maltosée. — Au bout de 24 heures, très léger début d'un enduit blanchâtre; cet enduit prend un aspect semi-liquide, visqueux; sa coloration devient blanc grisâtre dès le 3^e jour. La colonie s'épaissit et le 20^e jour, on observe un enduit assez épais, étalé, à bords arrondis, de coloration blanc terne.

Gélose jus de carotte. — Sur ce milieu, l'apparition de l'enduit est à peu près aussi rapide; le développement semble se faire plus rapidement et, dès le 2^e jour, on constate la formation d'un enduit légèrement plus gris

que le précédent et, comme lui, de consistance un peu visqueuse. Après 23 jours, l'enduit est épais, blanc jaunâtre, à bords arrondis.

Albumine d'œuf de poule. — Après 3 jours, la strie d'ensemencement se recouvre, en un ou deux points, d'un très mince enduit blanchâtre. Le développement se fait mal. Après 22 jours, l'enduit n'occupe pas une plus grande surface qu'au 3^e jour ; il est simplement un peu épaissi. Au 45^e jour, on note 2 taches blanches arrondies, de 3 à 4 millimètres de diamètre.

Raulin gélatiné acide. — Après 5 jours, léger début sur la strie. Le 7^e jour, de petites colonies grisâtres, en tête d'épingle, mesurant environ 1 millimètre de diamètre, confluent en un enduit mince de coloration grise. Les bords sont très finement déchiquetés.

Raulin gélatiné neutre. — Sur la strie d'ensemencement, où la culture n'apparaît qu'au 5^e jour, se forme un enduit légèrement plus abondant que sur le Raulin gélatiné acide, enduit qui est également de coloration grise.

Raulin et amidon de riz. — Pas de liquéfaction au 20^e jour.

Gélatine (en piqûre). — La colonie se développe en clou. A la surface du milieu, on a une tête arrondie d'un blanc mat ; en profondeur, la pointe à bords finement dentés est mince et de couleur blanc grisâtre. Il ne s'est pas produit de liquéfaction à l'examen du 35^e jour.

Culture géante. — Colonie bien développée, blanc grisâtre ; bords à larges lobes mais très peu profondément dentés. Le centre de la colonie est blanc crème ; sur les bords, des coins de coloration grise marquent l'emplacement des lobes.

b) Milieux liquides :

Jus de carotte. — Après une vingtaine de jours, le liquide est un peu trouble et il n'y a pas de voile; un très léger anneau gris blanchâtre sur les parois.

Liquide de Raulin acide normal. — Un dépôt se forme en 3 ou 4 jours; au bout d'une dizaine de jours il est assez abondant, constitué par des traînées disposées en rayons de roue. Quelques très minces parcelles flottent à la surface du liquide sans constituer un voile.

Liquide de Raulin neutre. — Cette levure y pousse mal et ne forme pas de voile; un dépôt très léger et quelques rares parcelles sur les parois de la fiole d'Erlenmeyer.

Liquide de Raulin avec urée. — Ni voile, ni anneau.

Liquides de Raulin sucrés :

Avec glucose et lactose. — Il n'y a pas de développement apparent après plusieurs jours, ni à température ordinaire, ni à 25°. Examinés à nouveau le 20^e jour, les tubes ne montrent qu'un léger dépôt; la même constatation est faite après un mois.

Avec maltose. — Le 11^e jour, à température ordinaire, apparaissent de légers grumeaux. Au bout de 17 jours, un anneau s'est formé sur les parois; cet anneau est grisâtre, peu épais; on observe aussi un trouble en traînées sur une certaine épaisseur de liquide au voisinage de la surface.

Avec glycérine. — Pas de voile, pas d'anneau.

Propriétés biologiques

I. TEMPÉRATURE. — Examinée à 14°, après 41 heures, la culture se présente sous l'aspect d'un enduit épais, blanchâtre, visqueux. Après 3 jours, le développement est médiocre et la culture n'a pas augmenté de surface. La plus belle croissance se produit à environ 19-20°. A 37°, cette espèce végète; à 45°, un très léger enduit, développé le 2^e jour au point d'ensemencement, diminue rapidement; après 4 ou 5 jours, il ne reste plus qu'une petite tache blanc grisâtre desséchée; à — 5° C., un très léger enduit montre des cellules qui semblent végéter très faiblement.

II. SPORULATION. — Examinée sur bloc de plâtre, après 2 jours, cette levure n'offre aucune formation de spores. Il en est de même aux examens postérieurs faits le 4^e et le 7^e jour après l'ensemencement. La présence de spores n'est constatée sur aucun milieu.

III. VOILES. — *Jus de carotte*: 0; anneau douteux.

Liquide de Raulin acide. — Ni voile; ni anneau.

Liquide de Raulin neutre, liquide de Raulin avec urée. — Pas de voile. Seul des *liquides de Raulin sucrés*, celui qui est additionné de maltose présente un anneau. Sur le *Raulin glycérimé*, il n'y a pas non plus formation de voile.

IV. FERMENTATIONS. — La fermentation est très nettement positive avec les solutions de lévulose et de saccharose. Légère avec celle de lactose, elle est négative avec maltose et glucose.

V. AFFINITÉS. — La forme arrondie de cette levure,

l'absence de voiles bien formés, font immédiatement penser à une *Torula*. Comme pour la *Torula I*, nous n'avons pu identifier cette espèce à une forme déjà décrite ; mais le désir de ne pas embarrasser de nouveaux noms une classe de champignons où la revision des espèces est tout à fait nécessaire, nous l'a fait dénommer *Torula II*. D'ailleurs, malgré leur fréquence dans l'air, les poussières, etc., ces *Torula* sont encore très peu débrouillées au point de vue botanique.

VI. ACTION PATHOGÈNE. — L'injection au cobaye, par voie sous-cutanée, de plusieurs centimètres cubes de culture pure sur tranche de carotte diluée dans le liquide réuni au fond du tube de Roux, n'a pas donné de résultat ganglionnaire.

CHAPITRE III

LEVURE *TORULA III* DU VACCIN

Origine

Cette levure a été trouvée dans une culture provenant de la pulpe fraîche récoltée le 21 avril dans les pustules du veau n° 15, inoculé avec un asino-vaccin marseillais. C'est d'une colonie arrondie de coloration grise croissant sur tranche de pomme de terre qu'a été isolée l'espèce étudiée.

Nous ne l'avons observée que trois ou quatre fois sur la trentaine de pulpes examinées. C'est donc la moins fréquente des quatre.

Caractères morphologiques

I. — CARACTÈRES MICROSCOPIQUES, FORMES ET DIMENSIONS

Ainsi que l'indique le dessin des figures 3 et 4, les cellules de cette espèce sont de taille plus grande que pour les deux *Torula* étudiées dans les chapitres précédents. Leur diamètre varie de 4 à 6,5 μ . Leur forme est, sur tranche de carotte examinée après 6 jours à 18°, le plus souvent sphérique ; quelques individus sont très légèrement ovalaires. Un certain nombre d'éléments

bourgeonnent ; plusieurs cellules ont à leur intérieur un granule réfringent qui mesure 1 à 2 μ de diamètre et se distingue nettement du reste du cytoplasme ; parfois on peut en compter deux ou trois dans une même cellule.

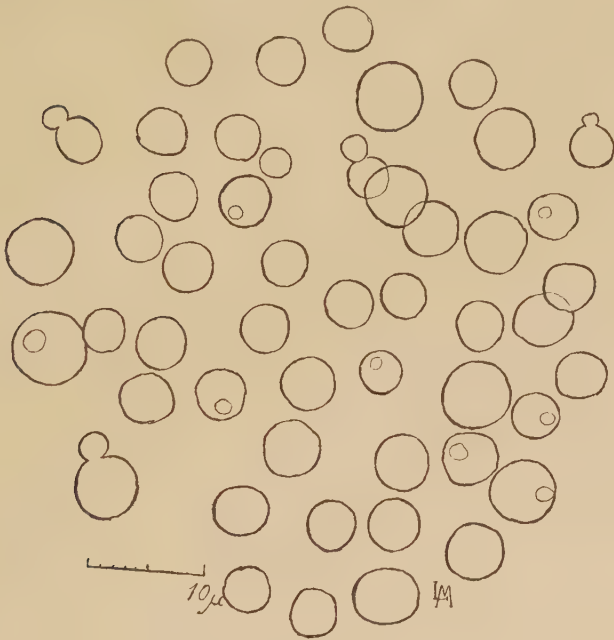


FIG. 5. — *Levure Torula III du vaccin.*

Culture sur carotte, âgée de 7 jours.

Dessin à la chambre claire ; ocul. 4 ; obj. apochr. 1,5 ; non réduit.

Comme caractère de comparaison avec les deux espèces déjà décrites, nous donnons le tableau et la courbe des fluctuations de la taille des cellules.

Diamètres . .	3,5	4	5	6	7
Fréquences . .	1,68 %	23 %	42,6 %	12,3 %	1,1 %

(Voir le tableau des courbes, p. 58.)

Modifications suivant la nature des milieux

a) Milieux solides :

Carotte (à température du laboratoire). — 6 jours : cellules sphériques, rarement ovalaires, mesurant, les plus petites $4\ \mu$, les plus grandes $6,5\ \mu$ de diamètre. Celles de $5\ \mu$ sont les plus fréquentes.

Sur carotte à 45° , après 8 jours, nous avons observé des formations très caractéristiques. Les cellules s'allongent en filaments, la membrane épaisse devient très visible; les cellules restées sphériques ont un diamètre supérieur de 1 à $2\ \mu$ à celui des cellules poussant à température ordinaire (voir fig. 7, p. 57). Après plus d'un mois, les éléments ont toujours le même aspect très réfringent.

Pomme de terre. — L'examen après 3 jours montre des cellules sphériques de dimensions plutôt grandes; plusieurs bourgeonnent activement.

Après 5 jours, des cellules recueillies dans la portion sèche, au sommet de la tranche de pomme de terre, endroit où les colonies prennent un aspect légèrement crayeux, présentent un aspect très spécial. Elles sont réunies par groupes de 3 ou 4 individus, parfois 2, mais rarement plus, dans une même gaine mucilagineuse. Cet aspect qu'avaient les cellules dans une goutte d'eau a été vérifié par des colorations (voir fig. 6).

Les dimensions sur ce milieu étaient au premier examen de $3,5\ \mu$, $5,5$ et $6\ \mu$; au deuxième examen, les cellules observées mesuraient assez souvent 6 à $7\ \mu$ de diamètre.

Gélose maltosée. — Examinées le 3^e jour, les cellules étaient arrondies, contenant souvent un assez gros granule réfringent. Dimensions : 4,5 μ , 5 et 6 μ . Nous n'avons pas trouvé de changement dans les recherches effectuées le 15^e et le 30^e jour.

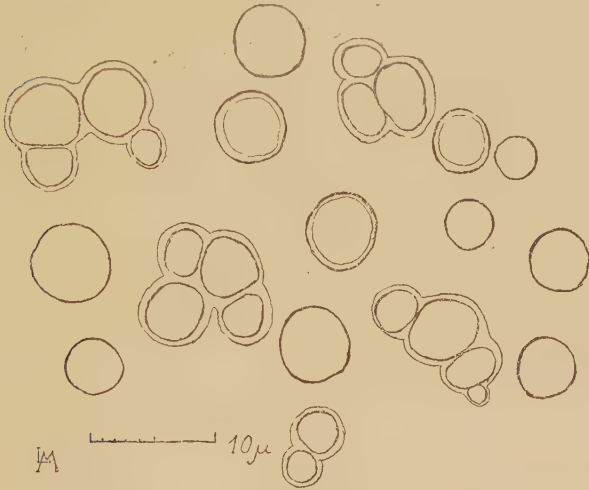


FIG. 6. — *Levure Torula III du vaccin.*

Culture sur pomme de terre, âgée de 3 jours (portion sèche de la tranche de pomme de terre).

Dessin fait avec l'appareil à dessiner de Zeiss; ocul. 4; obj. apochr. 1,5: non réduit.

Gélose jus de carotte. — Ressemblant aux éléments décrits plus haut sur tranche de carotte; le diamètre seul paraît différencier les cellules croissant sur ce milieu. La mensuration nous a donné : 4,5, 5 et 6 μ avec de nombreuses formes de 4,5 et 5 μ .

Albumine d'œuf de poule. — Après 7 jours, les cellules examinées sont sphériques; le cytoplasme est uniformément granuleux et jaunâtre; plusieurs ont une

membrane épaissie très nette. Dimensions : 4,5 μ , 6 et 8 μ . La culture âgée d'un mois montre des formes de grande dimension, avec souvent une forte membrane. Elles peuvent mesurer jusqu'à 9 μ de diamètre.

Raulin gélatiné acide. — Examen le 6^e jour : Éléments arrondis, avec souvent une membrane épaisse. Le diamètre varie de 4,5 à 6 μ , le plus fréquemment il est de 5 μ . Après 25 jours, on observe des cellules de petite taille (3 à 5 et 6 μ) à cytoplasme jaunâtre très granuleux, se rapprochant de l'aspect donné fréquemment par la *Torula* étudiée précédemment.

Raulin gélatiné neutre. — Membrane bien visible, cellules un peu plus grandes que sur le précédent milieu : 5-6,5-7 μ . Une culture âgée d'un mois présente les mêmes caractères microscopiques.

Raulin avec amidon de riz. — Cellules de petite dimension, membrane épaisse et nombreuses granulations dans le cytoplasme.

Gélatine (piqûre). — Culture en clou, blanc gris ; les bords de la pointe sont finement lobés.

Culture géante. — Uniformément blanche, larges lobes arrondis. La surface de la colonie est plane.

b) Milieux liquides :

Lait. — Ensemencement du 10 mai examiné le 17 : De nombreux éléments bourgeonnent, certains semblent avoir tendance à s'allonger. Les dimensions sont plutôt réduites : 3,5-4,5-5 μ ; cependant il y a un assez grand nombre de cellules de dimension ordinaire pouvant atteindre 7 μ .

Jus de carotte. — Les cellules, de petite taille, sont

en général arrondies; quelques-unes s'allongent. On observe d'assez nombreux bourgeonnements. Le cytoplasme contient fréquemment plusieurs assez gros granules très réfringents. Les mensurations donnent : $3,5\ \mu$, le plus souvent 4 et comme maximum $5,5\ \mu$.

Liquide de Raulin acide normal. — Un premier examen fait peu de jours après l'ensemencement donne très peu de cellules arrondies de petite taille. Après 15 jours, les éléments sont un peu plus nombreux, à membrane épaisse, à cytoplasme bien visible avec d'assez gros granules. Quelques individus sont ovalaires. Les plus petits ont $3\ \mu$; on en rencontre plusieurs de $4\ \mu$ et $4,5\ \mu$, les plus grands mesurent $7\ \mu$ de diamètre.

Liquide de Raulin neutre. — Des fragments du dépôt occupant le fond des récipients mis à l'étuve à 25° ou laissés à la température du laboratoire ne donnent que des débris et pas de formes vivantes.

Liquide de Raulin avec urée. — Après 7 jours, on voit quelques rares cellules arrondies, de petite taille, dont la plupart bourgeonnent. Presque toutes ont un contenu fortement granuleux.

Liquides de Raulin sucrés. — Cette levure ne se développe dans aucun des milieux additionnés de glucose, maltose, lactose.

Il en est de même pour le liquide de Raulin glycériné.

II. — CARACTÈRES MACROSCOPQUES DES CULTURES

a) Milieux solides :

Carotte à 18° . — Au bout de 2 jours, le développement est assez abondant. On a un enduit d'une certaine épaisseur, blanc grisâtre, de consistance semi-liquide.

Le 4^e jour, cet enduit, qui est devenu gris, a diminué d'épaisseur et pris un aspect glaireux. Ensuite il conserve cet aspect sans s'accroître en épaisseur, et la tranche de carotte est recouverte d'une gaine transparente grisâtre.

Pomme de terre. — Après 3 jours, un enduit blanc gris, granuleux, de peu d'épaisseur, couvre la surface de la tranche de pomme de terre. Après 18 jours, l'enduit est brun, de teinte légèrement verdâtre, peu épais. Au bout d'un mois, il est devenu irrégulièrement mamelonné, de teinte ocre ferrugineux.

Gélose maltosée. — Au bout d'une vingtaine d'heures, début de colonie blanchâtre sur la strie d'ensemencement. Après 3 jours, un enduit gris assez épais, à bords arrondis, recouvre la strie. Cet enduit s'épaissit ; il a pris au 30^e jour une coloration gris beige.

Gélose jus de carotte. — Aspect analogue, développement aussi rapide. La colonie prend bientôt une teinte brunâtre beige clair ; les bords sont très légèrement lobés.

Albumine d'œuf de poule. — Le 3^e jour, un léger enduit blanc brunâtre commence à se développer sur la strie. La croissance est très lente et l'examen au 20^e jour ne montre que 2 ou 3 taches brunâtres peu épaisses au niveau où avait apparu l'enduit.

Raulin gélatiné acide. — Début seulement après 5 jours ; sur la strie, on voit le 7^e jour un faible développement de colonies grisâtres en tête d'épingle, qui confluent bientôt en un enduit peu épais qui s'accroît extrêmement lentement.

Raulin gélatiné neutre. — Quoique d'apparition plus tardive, la levure semble se développer un peu mieux sur ce milieu que sur le précédent. Après 7 jours, sur la

strie d'ensemencement s'est développé un enduit mince, gris, plus abondant que celui qui pousse sur le Raulin gélatiné acide.

Raulin avec amidon de riz. — Pas de liquéfaction de l'empois.

Gélatine (en piqûre). — Clou gris ; la tête est constituée par un enduit assez épais, de coloration gris pâle, la pointe est étalée, grisâtre, à bords lobés arrondis. Après 25 jours, il ne s'est pas produit de liquéfaction.

Culture en flacon plat. — La colonie géante est de coloration uniformément blanche, avec, sur les bords, de larges lobes.

b) Milieux liquides :

Jus de carotte. — Après 11 jours, il s'est formé un voile blanc de 2 ou 3 millimètres. Un dépôt abondant s'est collecté au fond du tube. Le liquide resté limpide tient en suspension quelques traînées grisâtres plus nombreuses au voisinage de la surface.

Liquide de Raulin acide normal. — Nous avons déjà vu, par les résultats de l'examen microscopique, que la levure pousse mal sur ce milieu. Après 15 jours, on n'observe, dans la fiole d'Erlenmeyer, que quelques grumeaux qui flottent à la surface ou nagent dans le liquide, et quelques parcelles grisâtres qui reposent sur le fond du récipient. 40 jours après l'ensemencement, l'aspect macroscopique n'a pas changé.

Liquide de Raulin neutre. — Examiné après une quinzaine de jours, le liquide ne présente ni voile, ni anneau ; un dépôt pulvérulent peu épais couvre le fond du vase.

Liquide de Raulin avec urée. — 10 jours : mince dépôt ; après un mois, on observe des flocons en suspension dans le milieu, au voisinage de la surface, sur une épaisseur d'un demi-centimètre environ.

Liquide de Raulin avec sucres. — Seule la solution de maltose présente quelques grumeaux qui flottent dans le liquide ; mais, comme pour les autres liquidés de Raulin sucrés, il n'y a ni voile, ni anneau (10 jours à 18°). Après plus d'un mois, nous observons, dans la solution de glucose, quelques grumeaux rares disposés en anneau ; dans celle de maltose, l'aspect n'a pas changé.

Liquide de Raulin avec glycérine. — Rien.

Propriétés biologiques

I. TEMPÉRATURE. — A 14°, après une quarantaine d'heures, on observe, en un ou deux points de la surface de la tranche de carotte, un léger enduit peu épais, glaireux, gris blanchâtre. Au 6^e jour, le développement est médiocre. C'est, avec la levure provenant de la pulpe récoltée sur le veau n^o 7, celle qui pousse le plus mal à cette température. A 25°, cette levure pousse bien ; elle recouvre rapidement toute la surface du milieu d'un enduit glaireux blanc gris assez épais. A 37°, c'est la forme qui croît le mieux des quatre levures étudiées. On obtient, après 36 heures environ, un enduit blanc gris assez épais, plus consistant que celui qui a été observé sur carotte à 25°. La température optima semble donc être entre 25° et 37°. A 45°, alors que les trois autres levures ne poussaient plus, celle-ci nous a présenté, au bout de 3 jours, un début de développement ; la colonie,

légèrement augmentée de surface, examinée le 5^e jour, a montré au microscope des formes que nous avons dessinées (voy. fig. n^o 7). Les cultures mises au frigorifique à — 5° C. n'ont pas végété.



FIG. 7. — *Levure Torula III du vaccin.*

Culture sur carotte à 45°, âgée de 5 jours.

Ocul. 4 ; obj. apochr. 1,5 Zeiss ; dessin réduit d'environ 1/10.

II. SPORULATION. — Rien sur bloc de plâtre après 48 heures ; les examens, répétés plusieurs jours de suite, n'ont jamais donné d'endospores. Certains milieux, très défavorables, n'en ont pas montré non plus.

III. VOILES. — *Jus de carotte.* — Rien avant le

10^e jour ; le 11^e jour, on observe un voile blanc assez épais. Dépôt abondant, pas d'anneau.

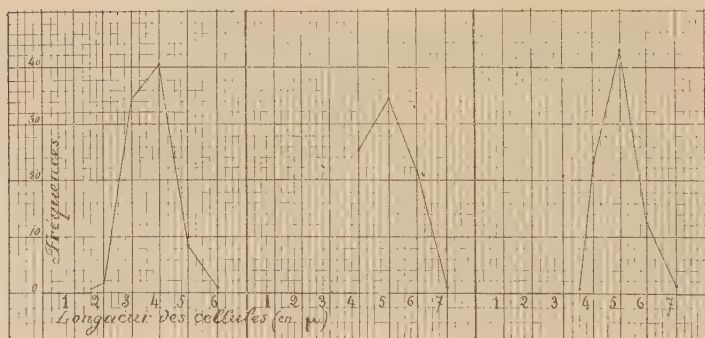
Liquide de Raulin acide. — Dépôt grumeleux. Dans aucun autre liquide, il n'y a formation de voile ou d'anneau. Seul un dépôt très peu important est noté pour le liquide de Raulin neutre, le liquide de Raulin sans azotate d'ammoniaque avec azote organique, le Raulin avec maltose.

IV. FERMENTATIONS. — Recherche négative avec les solutions de glucose, lactose, maltose, saccharose et lévulose.

V. AFFINITÉS. — Cette espèce appartient encore à la catégorie de *Torula* ; sa grande taille, les formes caractéristiques prises sur certains milieux, l'aspect macroscopique des cultures la distinguent très nettement. Nous l'avons nommée *Torula III du vaccin*.

VI. ACTION PATHOGÈNE. — Un cobaye qui avait reçu une injection de 2^{cmc}5 de culture diluée dans le jus de carotte n'a présenté aucun symptôme réactionnel.

Polygones de fréquences se rapportant aux dimensions
des cellules des levures « *Torula* I, II, III »



Torula I

Torula II

Torula III

CHAPITRE IV

LEVURE *MYCODERMA* DU VACCIN

Origine

Provient de la pulpe fraîche recueillie par raclage des pustules du veau n° 11, inoculé avec un asino-vaccin marseillais. A été isolée d'une petite colonie grise arrondie, mesurant à peu près 2 millimètres de diamètre, développée sur tranche de carotte.

C'est, après la forme *Torula I*, celle que nous avons le plus fréquemment rencontrée dans les pulpes fraîches ou glycinées.

Caractères morphologiques

I. — CARACTÈRES MICROSCOPIQUES, FORMES ET DIMENSIONS

Cette levure a une forme bien différente de celles dont l'étude précède. Une culture de 9 jours sur tranche de carotte, à la température de 18°, est constituée d'éléments plus longs que larges, présentant fréquemment un bourgeonnement en forme de semelle, la cellule fille étant allongée.

De rares cellules sont légèrement arrondies, mais aucune n'offre un contour circulaire. Le contenu est transparent, la plupart des éléments ont un ou plusieurs

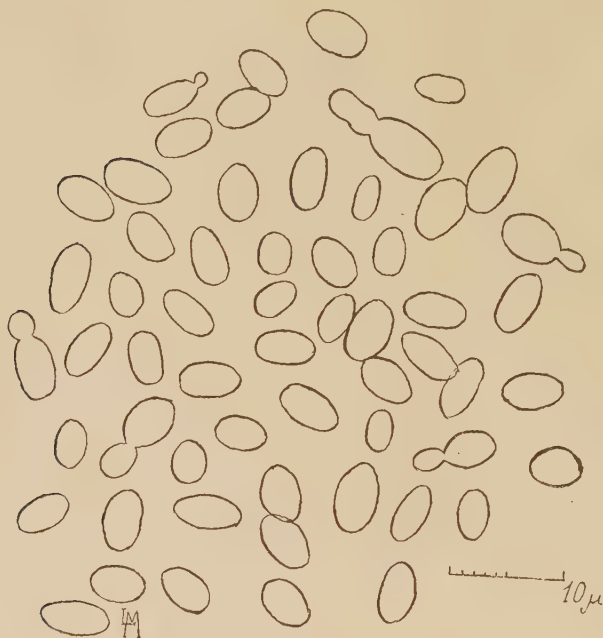


FIG. 8. — *Levure Mycoderma du vaccin*.

Culture sur carotte, âgée de 9 jours.

Dessin à la chambre claire; ocul. 4; obj. apochr. 4,5; non réduit.

granules réfringents, situés le plus souvent aux extrémités. La coloration au bleu Unna fait voir de gros corpuscules métachromatiques; nous les avons représentés dans la figure n° 9; ils sont bien visibles dans la cellule âgée à fond sombre; les cellules plus jeunes, moins colorées par le bleu, montrent, souvent sur les bords ou

aux pôles, de petits groupes de très fins corpuscules qui ont pris la teinte rouge violet.

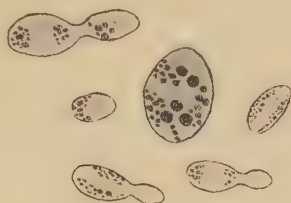


FIG. 9. — *Mycoderma du vaccin*.

Disposition des granulations métachromatiques dans les cellules d'une culture sur liquide de Raulin gélatiné neutre, âgée de 3 jours, d'après une préparation colorée au bleu Unna.

Dessin à la chambre claire ; ocul. 4 ; obj. apochr. 1,5 ; non réduit.

Voici les résultats d'une vingtaine de mensurations :

Longueur	Largeur	Longueur	Largeur
6	3	8	5,5
6	3,5	7	5
7	5	7	5
5,5	3,5	4,5	3
6	3,5	5,5	3
7	4	6	3,5
6	4	7	5
6	4	7	4
5,5	3,5	6	3,5
6	3,5	5,5	3
6	3	6	5

Modifications suivant la nature des milieux

a) Milieux solides :

Carotte à 18°. — Cellules allongées ; la longueur

varie de 4,5 à 8 μ , le plus fréquemment 6 μ (culture de 8 jours).

Pomme de terre. — Sur ce milieu, les éléments ovalaires sont plus nombreux et les formes mesurant 5,5 $\times$ 4 et 6 $\times$ 4, ne sont pas rares. Assez souvent un gros granule réfringent, parfois deux, sont nettement visibles (corpuscules métachromatiques). Dimensions : minima = 4,5 ; maxima = 6 ; les plus nombreuses mesurent 5,5 μ de longueur (examen au 3^e jour à 18°). Après 15 jours, l'aspect des éléments n'est pas modifié. Au 40^e jour, on observe des cellules d'assez grande taille dont la longueur peut atteindre 6 et 7 μ ; quelques éléments sont en forme de biscuit.

Gélose maltosée. — Les cellules sont allongées, rarement ovalaires. Le contenu est comme celui de la culture sur carotte pour la plupart des cellules. Chez quelques-unes, cependant, il est légèrement jaunâtre avec des granules réfringents plus nombreux que d'ordinaire. Sur la culture âgée de 4 jours, la longueur varie de 3,5 μ à 7 μ . Les formes mesurant 6 μ sont les plus nombreuses.

Gélose jus de carotte. — Après 3 jours, les éléments sont tous allongés, de grande taille ; souvent un gros granule réfringent est seul aperçu. Dimensions (en longueur seulement) : 5-6-7 μ . Bourgeonnement fréquent. Cet aspect reste le même dans les préparations observées le 15^e et le 30^e jour.

Albumine d'œuf de poule. — 8 jours : Les formes arrondies ovalaires sont à peu près aussi nombreuses que celles allongées. Fréquemment les cellules sont groupées par 3 ou 5, de façon assez irrégulière, en trèfle ou en chaîne avec des anneaux en croix. Le bourgeon-

nement est peu fréquent. La longueur varie de 4 à 6,5 μ . Après 42 jours, on observe quelques cellules s'allongeant en filaments. Assez souvent des éléments de grande taille (8-9 μ) sont, dans ces formations filamenteuses, placés entre des cellules de dimension ordinaire.

Raulin gélatiné acide. — 6 jours : Éléments allongés de grande dimension. Nombreux bourgeonnements. Longueur : 5-6-7 et 8 μ .

Raulin gélatiné neutre. — 7 jours : Sur ce milieu, les formes sont plus variées. Les éléments allongés sont les plus nombreux, quelques-uns sont courts et presque en biseau. Les éléments ovalaires sont souvent réunis deux par deux, un des pôles étant comme tronqué. La membrane est nette, les granules très réfringents aux deux pôles. Les mensurations donnent pour la longueur 5-6-7,5 μ .

Raulin avec amidon de riz. — Éléments allongés semblables à ceux des colonies développées sur carotte et sur gélose maltosée.

Milieu de Gorodkowa. — Ayant eu l'occasion d'étudier, en vue de rechercher si cette levure sporulait, le développement sur ce milieu, nous avons observé à plusieurs reprises l'aspect des cellules. Après 2 jours, elles ont l'aspect ordinaire de celles sur gélose maltosée. Leur taille est cependant légèrement plus petite. Après 5 jours, les formes allongées prédominent; le contenu est jaunâtre uniformément granuleux; les granules réfringents des pôles ne sont plus visibles. Quelques cellules gardent encore cependant un gros granule, mais elles sont rares. Dimensions : 4-6-6,5 μ .

b) Milieux liquides :

Lait. — 10 jours : Forme allongée, rarement ovalaire. Le bourgeonnement paraît actif. Quelques éléments



FIG. 10. — *Mycoderma du vaccin.*

Cellules provenant d'un voile formé sur jus de carotte, 10 jours à 18° ; nombreux globules huileux.

Dessin à la chambre claire ; ocul. 4 ; obj. apochr. 1,5.

bourgeonnants s'étranglent en leur milieu. Longueur ordinaire : 5,5-6-7 μ . Même aspect après un mois.

Jus de carotte. — 3 jours : Formes allongées de grandes dimensions. Les cellules du voile, observées après 10 jours, présentent de nombreux granules réfringents

plus volumineux que ceux observés sur les autres milieux, disposés aux pôles ou en chaîne le long de l'un des bords. (Cf. fig. 10.) La coloration rose que prennent ces formations avec la teinture d'orcanette acétique indique que ce sont des globules huileux. Longueur des cellules = 6, 7 et 9 μ .

Liquide de Raulin acide normal. — 10 jours à 18° : Les éléments ovalaires sont les plus nombreux; quelques-uns offrent une membrane épaisse; parfois ils se groupent en chaînettes de 3 ou 4 individus. Le plus souvent la longueur est de 6 μ ; les plus petits mesurent 5,5, les plus allongés 7 μ .

Liquide de Raulin neutre. — Examen après 3 jours : Les formes allongées dominant, mais les formes ovalaires sont plus fréquentes que dans les autres milieux (sauf le liquide de Raulin acide); plusieurs bourgeonnent. La longueur varie de 3 à 6 μ . Quelques rares petites cellules mesurent 3 μ . Au bout d'un mois et 10 jours, on observe un assez grand nombre de cellules déformées, mais de taille ordinaire.

Liquide de Raulin avec urée. — 12 jours : Cellules à gros granules réfringents bien visibles; bourgeonnement assez fréquent; quelques formes ovalaires. Elles sont longues de 5,5 et 6 μ .

Liquides de Raulin sucrés :

Avec glucose. — Formes allongées et formes ovales. De nombreux éléments bourgeonnent par plusieurs points à la fois. Dimensions : 5-5,5-7 μ (10 jours).

Avec lactose. — Cellules de grande taille, allongées parfois en biscuit légèrement étranglé au milieu; bourgeonnement fréquent par petits groupes de deux ou trois

cellules filles à un même pôle de la cellule mère. Quelques-unes sont déformées en massue. La longueur varie de 6 à 9 μ (10 jours).

Avec maltose. — Aspect des cellules observées le plus ordinairement; longueur 4,5-5 et 6 μ . L'examen a été fait après 10 jours. Des préparations examinées le 20^e jour montrent des formations filamenteuses, quelquefois ramifiées. (Voir les fig. 11 et 12.)



Mycoderma du vaccin.

FIG. 11. — Cellules d'un voile formé sur liquide de Raulin maltosé.

FIG. 12. — Cellules d'un voile formé sur liquide de Raulin maltosé; formations filamenteuses.

Dessinées à la chambre claire avec l'appareil de Zeiss; ocul. 4; obj. apochr. 4,5 Zeiss; dessin réduit de 16 à 9 centimètres.

Liquide de Raulin glyciné. — Quelques individus sont groupés par chaîne de 3 ou 4. On observe des cellules ovalaires à membrane épaisse. Dimensions : 5 et 6,5 μ .

II. — CARACTÈRES MACROSCOPIQUES DES CULTURES

a) Milieux solides :

Carotte à 18°. — Enduit visqueux blanc grisâtre peu épais. Se développe plus lentement que les cultures sur même milieu des trois autres levures. Il faut 4 ou 5 jours pour couvrir une petite surface de la tranche de carotte. Comme nous le verrons plus loin, à l'étude des températures de développements, c'est à température assez basse que cette levure semble le mieux végéter.

Pomme de terre. — L'enduit blanc brunâtre, qui se forme à température du laboratoire plus rapidement que sur tranche de carotte, prend après 5 à 6 jours une coloration gris beige qui s'accroît après 10 à 12 jours et devient beige foncé, avec des bords rose lie de vin. La culture forme un enduit épais, à surface granuleuse. Les bords sont arrondis avec indication de lobes sur le pourtour.

Gélose maltosée. — Après 48 heures, culture blanc gris sur la strie d'ensemencement. Au 4^e jour, on a une belle strie grise à bords légèrement sinueux.

Jus de carotte gélosé. — Le 3^e jour, on voit une culture en enduit gris assez épais, à bords arrondis, qui recouvre la strie d'ensemencement.

Gélose de Gorodkowa. — Sur ce milieu, le champignon pousse assez abondamment. Après quelques jours, une belle colonie gris rosé occupe toute la hauteur de la strie ; un bourrelet en saillie large de 1 à 2 millimètres limite la culture, les bords sont sinueux. Au bout d'un

mois, la culture est entièrement teintée de rose, les bords restant gris rosé.

Albumine d'œuf de poule. — Début, le 2^e jour, d'un faible enduit blanc. Après 10 jours, il est de coloration rosée ; la croissance est très lente. La levure *Mycoderma* pousse mal sur ce milieu.

Raulin acide gélatiné. — La culture apparaît seulement au 6^e jour. Le 10^e jour, il s'est développé un enduit blanc gris, à bords unis, d'aspect desséché.

Raulin neutre gélatiné. — De même que pour le milieu précédent, le début de la culture sur Raulin neutre gélatiné est plus tardif que pour les autres espèces décrites, et c'est seulement le 6^e jour que de petites colonies grises se développent. Après 10 jours, la strie est grise, moins épaisse que sur Raulin acide gélatiné, à bords unis.

Raulin avec amidon de riz. — Une très légère liquéfaction se produit à la surface de l'empois.

Gélatine en piqûre. — Colonie en clou. La tête, de coloration gris rosé, est étalée, à bords lobés ; la pointe présente de larges lobes, mais peu profonds. Il ne se produit pas de liquéfaction.

Culture géante. — Colonie en large tache, à bords plats, blanc grisâtre ; le centre est teinté de rose.

b) Milieux liquides :

Jus de carotte. — Après 10 jours, voile épais blanc rosé dont les bords sont repliés en anneau sur les parois du récipient ; un dépôt assez abondant en garnit le fond.

Liquide de Raulin acide normal. — Examiné en fiole d'Erlenmeyer après 14 jours : de très nombreuses petites parcelles arrondies, grisâtres, parfois confluentes en

taches de diamètre dissemblable, forment une sorte de voile. Le liquide est limpide ; un très léger dépôt floconneux s'est accumulé au fond.

Liquide de Raulin neutre. — A 25° : 48 heures après l'ensemencement, on observe un début de voile très dilacéré, gris ; de petits flocons de même couleur adhèrent aux parois. Le 3^e jour, le voile est plus continu ; sur une certaine épaisseur (quelques millimètres), le liquide, au voisinage de la surface, tient en suspension de nombreux flocons. L'examen macroscopique du 15^e jour montre un voile continu, mais mince, un anneau bien formé ; le liquide contient des flocons sur l'épaisseur d'un demi-centimètre.

Liquide de Raulin avec urée. — 4 jours : Début d'anneau gris, mince. 12 jours : Voile peu épais formé de taches ayant l'aspect graisseux ; anneau ; le liquide n'est pas troublé.

Liquides de Raulin sucrés :

Avec glucose. — Après 3 jours, on ne note qu'un léger début d'anneau. Le 5^e jour, un voile mince, déchiqueté, a fait son apparition. Le 12^e jour, ce voile est plus étendu et occupe toute la surface, mais il est interrompu par de nombreuses fentes et de peu d'épaisseur.

Avec lactose. — Le 3^e jour, un léger dépôt s'est formé au fond ; le 5^e jour, il existe un voile épais blanc rosé avec interposition d'air. Ce voile s'épaissit de plus en plus et prend une coloration rose jaunâtre.

Avec maltose. — Très léger dépôt au début. Après 5 jours, on observe un trouble léger sur plusieurs centimètres dans le liquide (en tube). Le 12^e jour il s'est formé un voile gris mince, et des traînées blanc grisâ-

tre flottent dans le milieu. Au 20^e jour, on observe un beau voile plissé renfermant des bulles d'air.

Liquide de Raulin avec glycérine. — Rien le 3^e jour. Quelques très minces parcelles de culture grise flottent dans le liquide examiné après 5 jours. Le 12^e jour, on observe cependant la formation d'un voile mince et d'un anneau sur les parois. Tous deux sont de coloration grise.

Propriétés biologiques

I. TEMPÉRATURE. — Cette levure pousse à basse température. Après 40 heures à 14° (température du sous-sol du laboratoire), un enduit blanc gris, visqueux, assez épais, se développe en plusieurs points de la tranche de carotteensemencée. Le 6^e jour, cet enduit en occupe toute la surface; il est épais et de teinte blanc grisâtre. A 18-20°, le développement est encore assez beau, mais à 25° la culture pousse mal; à 37°, la croissance est très lente; à 45°, la levure ne végète plus.

Nous avons examiné au microscope l'aspect des cellules des cultures à 14° et 45°. A 14°, après 12 jours, les éléments sont allongés, mesurant 5 à 6 μ . de longueur; souvent on observe un ou deux gros granules réfringents. De nombreux éléments bourgeonnent.

A 45°, après 5 jours, les cellules sont très petites; leur plus grande longueur ne dépasse pas 4 μ . Quelques-unes s'étirent légèrement et se déforment, mais il n'y a pas de formation mycélienne.

A — 5° C., les cellules observées au microscope paraissent se maintenir vivantes, mais la levure ne végète pas à cette température.

II. SPORULATION. — Examinée à plusieurs reprises sur bloc de plâtre, nous n'avons pas observé la formation de spores. Aussi négative a été la recherche sur la gélose de Gorodkowa, milieu sur lequel cette espèce pousse bien. Les voiles, les cultures en milieux défavorables, n'ont jamais montré de sporulation.

III. VOILES :

Jus de carotte. — Voile épais, anneau, dépôt.

Liquide de Raulin acide normal. — Voile très mince, anneau ?, dépôt floconneux.

Liquide de Raulin neutre. — Voile continu dès le 3^e jour, anneau.

Liquide de Raulin avec urée. — Voile et anneau.

Liquides de Raulin sucrés :

Avec glucose. — Voile déchiqueté ; pas d'anneau bien net.

Avec lactose. — Voile de mycoderme très caractéristique, dépôt, anneau se confondant avec les bords du voile.

Avec maltose. — Voile plissé épais et très léger dépôt.

Liquide de Raulin avec glycérine. — Voile et anneau.

IV. FERMENTATIONS. — Epreuve négative avec les solutions de glucose, lévulose, maltose, saccharose, lactose.

V. AFFINITÉS. — Malgré la forme ovalaire d'une grande partie des éléments, la présence de voiles muqueux emprisonnant l'air, l'absence de fermentation, rapprochent beaucoup cette levure des Mycodermes. Nous l'appellerons donc *Mycoderma du vaccin*.

VI. ACTION PATHOGÈNE. — Une dilution de culture

sur carotte âgée de 3 jours a été répartie en 3 doses. 1^{re} 5 est injecté dans la veine marginale de l'oreille du lapin. Une autre dose de 2 cm. c. est injectée par voie sous-cutanée au cobaye; enfin, la 3^e dose est répandue sur les scarifications faites à la vulve. Sauf un léger suintement dans la région vulvaire (observé un soir, et tari le lendemain), ces inoculations ont été complètement négatives.

CHAPITRE V

TABLEAUX RÉCAPITULATIFS

TABLEAU I. — LEVURE « TORULA I »

A. Caractères morphologiques

MILIEUX SOLIDES	CAROTTE	POMME DE TERRE	ALBUMINE	GÉLOSE MALTOSEE	GÉLOSE Jus de carotte	LIQUIDE DE RAULIN GÉLATINÉ	
						acide	neutre
Aspect et coloration	Blanc brill.	mamelonné bl. grisâtre	faib. enduit blanchâtre	blanc	blanc grisâtre	enduit bl mince	id.
Dimension des cellules (en μ). .	2 à 5	2 à 5	2 à 4	2 à 5	4 à 5	3 à 5	3 à 5
Forme des cellules	sphérique	id.	id.	id.	id.	id.	id.
Croissance . . .	rapide	Ass rapide	lente	ass. rapide	rapide	lente	très lente

MILIEUX LIQUIDES	MOUT de BIÈRE	JUS de CAROTTE	LIQUIDE DE RAULIN						
			acide	neutre	+ urée	+ glucose	+ maltose	+ lactose	+ glycé.
Aspect	voile anneau dépôt	voile anneau	voile mince dépôt	voile anneau dépôt	voile anneau	anneau	voile anneau faible dépôt	voile mince anneau	voile anneau
Dimension des cellules (en μ). .	3 à 4	3 à 5	4 à 5	2 à 3,5	3 à 4	2,5 à 3,5	2 à 3	2,5 à 4	3 à 4
Forme des cellules	sphériq. + qq. déform.	id.	ovoïde allongée	id.	sphériq.	id.	id.	suboval.	sphériq.
Croissance . . .	rapide	lente	tr. lente	lente	ass.rap.	lente	rapide	ass.rap.	lente

B. Caractères biologiques

TEMPÉRATURE			SPORULATION
MINIMA	OPTIMA	MAXIMA	
entre — 5° et + 14°	19 à 20°	37 à 45°	
			0

VOILES

	JUS DE CAROTTE	LIQUIDE DE RAULIN						
		acide	neutre	+ urée	+ glucose	+ lactose	+ maltose	glyoériné
Présence. . . .	+	+	+	+	+	0	+	+
Apparition . . .	»	»	»	»	»	»	»	»

FERMENTATIONS

AVEC GLUCOSE	AVEC MALTOSÉ	AVEC SACCHAROSÉ	AVEC LÉVULOSE	AVEC LACTOSÉ
0	0	+	+	légère

TABLEAU 2. — LEVURE « TORULA II »

A. Caractères morphologiques

MILIEUX SOLIDES	CAROTTE	POMME DE TERRE	ALBUMINE	GÉLOSE MALTOSEE	GÉLOSE Jus de carotte	LIQUIDE DE RAULIN GÉLATINÉ	
						acide	neutre
Aspect et coloration	blanc grisâtre	chagriné blanc sale	faib. enduit blanchâtre	visqueux blanchât.	id.	faible enduit gris	id.
Dimension des cel- lules (en μ) . . .	4 à 6	id.	3,5 à 6	4 à 5	id.	3 à 6	id.
Forme des cellules.	sphériques ovales	sphériques	id.	f. ovalair. nombr.	sphériq.	sphériq. f. géantes	sphériq
Croissance . . .	ass. rapide	rapide	lente	rapide	id.	très lente	lente

MILIEUX LIQUIDES	JUS DE CAROTTE	LIQUIDE DE RAULIN						
		acide	neutre	+ urée	+ glucose	+ maltose	+ lactose	glycériné
Aspect	léger anneau	dépôt	anneau? dépôt	0 voile 0 ann	léger dépôt	anneau	léger dépôt	0 voile 0 ann.
Dimension des cel- lules (en μ) . . .	4 à 5	5 à 6	6 à 7	»	»	4 à 6	»	»
Forme des cellules.	sphériques	sphériq. déform.	sphériq. ovalair.	»	»	sphériq.	»	»
Croissance . . .	très lente	lente	tr. lente	»	»	tr. lente	»	»

B. Caractères biologiques

TEMPÉRATURE			SPORULATION
MINIMA	OPTIMA	MAXIMA	
entre — 5° et + 14°	19 à 20°	37 à 45°	0

VOILES

	JUS DE CAROTTE	LIQUIDE DE RAULIN						
		acide	neutre	+ urée	+ glucose	+ lactose	+ maltose	glycériné
Présence	0	0	0	0	0	0	0	0
Apparition . . .	»	»	»	»	»	»	»	»

FERMENTATIONS

AVEC GLUCOSE	AVEC MALTOSE	AVEC SACCHAROSE	AVEC LÉVULOSE	AVEC LACTOSE
0	0	+	+	légère

TABLEAU 3. — LEVURE « TORULA III »

A. Caractères morphologiques

MILIEUX SOLIDES	CAROTTE	POMME DE TERRE	ALBUMINE	GÉLOSE MALTOSÉE	GÉLOSE Jus de carotte	LIQUIDE DE RAULIN GÉLATINÉ	
						acide	neutre
Aspect et coloration	blanc grisâtre	mamelonné ocre	blanc brunâtre	épais gris beige	b. lobés beige clair	gris	id.
Dimension des cel- lules (en μ) . .	4 à 5	4 à 6	5 à 9	4 à 6	id.	3 à 6	5 à 7
Forme des cellules.	sphériques	sphériques f. zooglëiq.	sphériques	sphëriq.	id.	»	»
Croissance . . .	rapide	rapide	très lente	rapide	rapide	lente	lente

MILIEUX LIQUIDES	JUS DE CAROTTE	LIQUIDE DE RAULIN						
		acide	neutre	+ urée	+ glucose	+ maltose	+ lactose	glycériné
Aspect	voile, dépôt	dépôt		dépôt	tr. faible anneau			
Dimension des cel- lules (en μ) . .	3 à 5	5 à 7	Pousse mal sur tous ces milieux					
Forme des cellules.	sphériques parf. allongées	sphëriq.						
Croissance . . .	assez rapide	tr. lente						

B. Caractères biologiques

TEMPÉRATURE			SPORULATION
MINIMA	OPTIMA	MAXIMA	
10 à 14°	25 à 30°	végète à 45°	0

VOILES

	JUS DE CAROTTE	LIQUIDE DE RAULIN						
		acide	neutre	+ urée	+ glucose	+ lactose	+ maltose	glycériné
Présence. . . .	+	0	0	0	0	0	0	0
Apparition . . .	rapide	»	»	»	»	»	»	»

FERMENTATIONS

AVEC GLUCOSE	AVEC MALTOSÉ	AVEC SACCHAROSÉ	AVEC LÉVULOSE	AVEC LACTOSÉ
0	0	0	0	0

TABLEAU 4. — MYCODERMA

A. Caractères morphologiques

MILIEUX SOLIDES	CAROTTE	POMME DE TERRE	ALBUMINE	GÉLOSE MALTOSÉE	JUS DE CAROTTE gélifié	LIQUIDE DE RAULIN GÉLATINÉ	
						acide	neutre
Aspect et coloration	blanc grisâtre	granuleux beige foncé	faib. enduit blanc	gris rose	gris	gris rose	id.
Dimension des cel- lules (en μ) . .	6	4 à 6	4 à 7	3,5 à 7	5 à 7	5 à 8	5 à 7
Forme des cellules.	allongée	allongée ovalaire	allongée ovalaire	allongée	id.	allongée	allongée ovalaire
Croissance . . .	lente	rapide	très lente	rapide	ass. rapide	très lente	id.

MILIEUX LIQUIDES	JUS DE CAROTTE	LIQUIDE DE RAULIN						
		acide	neutre	+ urée	+ glucose	+ maltose	+ lactose	glycériné
Aspect	voile, anneau dépôt	voile dépôt	voile anneau	voile anneau	voile	voile épais anneau	voile épais	voile anneau
Dimension des cel- lules (en μ) . .	6 à 9	6 à 7	3 à 6	5 à 6	5 à 7	4,5 à 6	6 à 9	5 à 6
Forme des cellules.	allongée	ovalaire	allongée ovalaire	allongée	allongée ovalaire	filam.	allongée déform.	ovalaire
Croissance . . .	rapide	lente	ass. rap.	lente	lente	lente	rapide	lente

B. Caractères biologiques

TEMPÉRATURE			SPORULATION					
MINIMA	OPTIMA	MAXIMA						
entre — 5 et 10°	18 à 20°	37 à 45°	0					

VOILES								
	JUS DE CAROTTE	LIQUIDE DE RAULIN						
		acide	neutre	+ urée	+ glucose	+ lactose	+ maltose	glycériné
Présence. . . .	+	+	+	+	+	+	+	+
Apparition . . .	rapide	tardive	rapide	lente	lente	rapide	rapide	lente

FERMENTATIONS				
AVEC GLUCOSE	AVEC MALTOSÉ	AVEC SACCHAROSÉ	AVEC LÉVULOSE	AVEC LACTOSÉ
0	0	0	0	0

TABLEAU 5

PULPES VACCINALES ¹			TORULA I	TORULA II	TORULA III	MYCODERMA
Marseille	4	glycérinée . .	+	+		+
Paris	5	glycérinée . .	+			
Paris	6	non glycérinée.	+	+		
		glycérinée . .	+	+		
Marseille	7	non glycérinée	+	+		
		glycérinée . .	+	+		
Asino Marseille	8	non glycérinée.	+		+	+
		glycérinée . .	+			
Paris	10	non glycérinée.				+
Marseille	11	non glycérinée.		+		+
Lille	12	non glycérinée.	+	+		
Lausanne	13	non glycérinée.	+			
Marseille	12	non glycérinée	+			+
Paris	13	non glycérinée.	+			+
		glycérinée . .	+	+		
Marseille	14	non glycérinée.	+			
Asino Marseille	15	non glycérinée.	+		+	
		glycérinée . .	+	+	+	
Lapin	16	non glycérinée.	+		+	
Lille	17	non glycérinée.	+	+		
Asino Marseille	18	non glycérinée.	+	+		
Asino Marseille	23	glycérinée . .	+	+	+	
	24	— . .	+	+	+	
Asino Marseille		glycérinée . .	+			
provenance directe.						

1. Le nom de ville indique la provenance du vaccin inoculé au veau dont le numéro suit.

Nous donnons dans le tableau 5 (page 77) le résultat des recherches faites sur la fréquence des levures étudiées dans les pages qui précèdent.

On voit immédiatement que la présence de levures a été constatée dans toutes les pulpes fraîchement préparées que nous avons examinées. La forme *Torula I* a été reconnue dans presque tous les vaccins, puis c'est la forme *Torula II* qui est la plus fréquente, la forme *Torula III* et la forme *Mycoderma* ayant été trouvées bien moins souvent.

Une autre constatation à faire, c'est la présence des levures dans la pulpe fraîche et dans la pulpe glycinée en nombre à peu près semblable. (Voir le tableau comparatif du chapitre II, 3^e partie, p. 92.)

Mais tous les vaccins dont il s'agit dans ces deux tableaux sont âgés de moins d'un ou deux mois; nous avons recherché les levures dans des pulpes plus âgées. Les résultats ont été complètement négatifs pour des pulpes recueillies depuis 5 et 6 mois, depuis 3 mois même pour un échantillon de vaccin en tube provenant de l'Institut de vaccination de Tours.

Les premières avaient été conservées dans un sous-sol dont la température a varié de 0 à 10°, la dernière était restée à la température d'un laboratoire, 18 à 20°.

Ajoutons que ces recherches nous ont permis d'observer en même temps que les levures un certain nombre d'autres microorganismes. Nous croyons utile de citer les formes suivantes rencontrées plus ou moins fréquemment.

Des champignons :

Un *Penicillium* provenant d'une pulpe employée par

le service de vaccination de la ville de Besançon. Ce *Penicillium* a été isolé et nous avons demandé à M. J. Beauverie de bien vouloir le déterminer.

« Mycelium hyalin blanc ; les cultures ont un aspect farineux.

Hyphes stériles couchés, cloisonnés, ramifiés ; hyphes fertiles dressés, cloisonnés, courts, comportant seulement 2 ou 3 cellules superposées ; longueur 20 à 40 μ , le plus souvent 20 ; ces hyphes fertiles sont ramifiés à l'extrémité en pinceau.

Conidies ovoïdes allongées de 6 $\mu \times$ 2,5 μ .

Cette forme se rapproche le plus de :

Penicillium brevicaulis Sacc., var. *glabrum* Thom. Elle en diffère surtout par les conidies plus petites dans notre forme, soit 2,5 $\times$ 6 au lieu de 7-8 $\times$ 8-10 μ ; par une forme ovoïde mais non pyriforme. »

Un *Streptothrix* retrouvé dans 2 ou 3 tubes de gélose maltoséeensemencée avec des pulpes lyonnaises est sans doute celui signalé par SABRAZÈS et JOLY [CLXIV bis].

Des bactéries :

Sur gélose maltoséeensemencée avec la pulpe de Lausanne¹ V. 39, nous avons observé des colonies blanc porcelaine constituées de *cocci* prenant le Gram. des bacilles très fins ; dans V. 40 (Suisse) : des staphylocoques donnant sur gélose maltosée des colonies arrondies blanches.

Un enduit laiteux développé sur pomme de terre a montré à l'examen microscopique des bactéries possé-

1. Nous indiquons, pour abrégé, le numéro du veau avec la provenance du vaccin qui lui a été inoculé.

dant une très forte capsule, de dimensions tout à fait anormales. Nous avons observé également dans les préparations faites de cet enduit des diplocoques, des bacilles avec condensation aux pôles, des bacilles très fins et des bacilles à spores exogènes.

V. 4 M. a montré des *cocci* en colonies blanches non liquéfiantes, des bacilles grêles et des bacilles plus épais formant des colonies en enduit grisâtre sur agar maltosé.

V. 5 P., des staphylocoques en colonies blanches laiteuses arrondies et des cocco-bacilles.

V. 6 P., des bacilles courts, trapus, de gros staphylocoques; V. 7 M. et V. 8 M., des *cocci* en colonies jaune soufre.

La pulpe V. 10 P. a montré des *cocci* souvent disposés par deux; il en a été de même pour V. 11 M. Dans ces deux dernières nous avons constaté aussi la présence de *cocci* blancs liquéfiant.

Les cultures des autres pulpes examinées nous ont fourni, la plupart, des colonies blanches ou blanc grisâtre qui ressemblaient souvent à des colonies de levures et n'étaient reconnues qu'à l'examen microscopique.

En somme, ces quelques indications s'accordent bien avec les résultats du travail de SACQUÉPÉE [CLXV] qui décrit dans la pulpe vaccinale : un *coccus* blanc non liquéfiant, un *coccus* blanc liquéfiant, un *coccus* jaune, le *B. subtilis*, le *B. mesentericus vulgatus*.

Un staphylocoque en colonie jaune qui nous semblait intéressant, et que nous avons isolé, nous a donné sur agar, en strie, un bel enduit jaune offrant presque la coloration du staphylocoque doré. Mais il ne liquéfiait pas

la gélatine et présentait sur agar une surface plissée, en certains points vermiculée, n'ayant pas l'aspect granuleux que le *S. pyogenes aureus* prend sur ce milieu.

Cette forme, que d'ailleurs nous n'avons observée qu'une fois, doit être, comme les éléments encapsulés et les bactéries à spores en clou signalées plus haut, d'apparition accidentelle dans la pulpe vaccinale.

TROISIÈME PARTIE

ROLE DES LEVURES

CHAPITRE PREMIER

LES LEVURES ET LE VIRUS VACCINAL

Dès les premiers travaux de HALLIER et ZURN et de KEBER, que nous avons mentionnés précédemment, on s'est demandé si les éléments organisés trouvés dans la lymphe étaient les agents du contag. CHAUVEAU [LVIII], à la même époque, démontrait que le virus réside dans des corpuscules solides. Il est donc tout naturel que les premiers auteurs qui se sont occupés de la question aient vu dans le parasite qu'ils avaient observé le porteur du virus vaccinal. Avec KEBER [CXXI], une forme dont la description paraît bien se rapporter à une levure est considérée comme agent de contag. Avec COHN [LVII], c'est un *Microsphæra*; KLEBS [CXXIV *ter*] décrit le *Tetracoccus variolæ*. Grâce au perfectionnement des milieux optiques et des procédés de culture, on découvre dans la lymphe une série de bactéries : MEGNIN, KOCH, QUIST [CLVI] décrivent des microcoques; VOIGT,

parmi les trois espèces qu'il étudie, sépare un microcoque de petite taille, souvent disposé en groupes de deux éléments, formant des colonies blanches sans liquéfaction de la gélatine ; il l'appelle *Vaccinocoque* [CLXXII].

De nombreux auteurs ont encore étudié la question de la nature bactérienne du virus vaccinal. Nous renvoyons aux Historiques de L. PFEIFFER [CL et CLI], de SACQUÉPÉE [CLXV], MACÉ [CXXXVII], pour l'étude de ce sujet. Citons seulement, parmi les plus affirmatifs, GARRÉ (1887) : il considère un microcoque comme spécifique ; COPEMAN [LXV], qui décrit le *Vaccinebacillus*, petit bacille fin, différent nettement du bacille du foin. C'est un diplocoque pour RUETE et ENOCH (1893) [CLXIV]. Pour d'autres, il s'agit de parasites végétaux plus élevés en organisation. Ainsi, BUTTERSACK [XLVI] décrit des filaments et des spores dans la lymphe vaccinale, les filaments étant plus nombreux dans les pustules en voie de croissance, où ils forment un réseau délicat. Les spores sont, d'après cet auteur, plus abondantes après la maturité. Par inoculation à l'animal, ces formations auraient donné naissance à des pustules typiques. D'après KELSCH [CXXII], il s'agirait là de pseudo-champignons qui seraient seulement des productions artificielles dues à une technique opératoire défectueuse.

Nous pouvons rappeler ici que, en ce qui concerne la variole, dès 1881, RENAULT [CLVIII] avait signalé des inclusions cellulaires de type tout à fait particulier dans les processus de pustulation variolique. VAN DER LOEFF décrit, dans le sang des varioleux, des enfants vaccinés et des veaux inoculés (au début de l'affection), un parasite animé de mouvements propres, par oscillation de

flagella. Mais c'est surtout en 1892 que les travaux de GUARNIERI [CII] orientent les recherches d'un côté tout différent avec la découverte du *Cytorictes vaccinae*. Aussitôt apparaissent des contradicteurs : FERRONI et MASSARI [XCII], E. PFEIFFER [CXLVII]. D'autres protozoaires sont décrits par L. PFEIFFER [CXLIX], BOSCH [XXXI], CLARKE, ROGER (dans la variole), FUNCK, avec le *Sporidium Vaccinale* [XCV], ISHIGAMI [CXVII] qui étudie un parasite très voisin du *Microsporidium bombycis* de la pébrine, VOLPINO [CLXXIII], etc. SIEGEL [CLXVII] déclare avoir réussi à obtenir des cultures pures de *Cytorictes Guarnieri*. Ce savant étudie à la même époque les *granules* du virus vaccinal ; mais, devant les résultats contradictoires de ses recherches, il réserve sa réponse. A l'hypothèse de GUARNIERI, répondent PROWAZEK [CLIV], qui fait dériver le pseudo-protozoaire d'altérations du noyau ; SALMON [CLXVI], HUCKEL, qui le considèrent comme un aspect présenté par les altérations de cellules migratrices. Avec BORREL, KELSCH [CXXII], après des expériences de culture par inoculation dans la cornée de lapin, conclut à des formes de polynucléaires.

En même temps que ces nombreuses recherches, paraissent des études où d'autres microbes sont proposés comme agents de contagie : PROCA, en 1910 [CLIII], décrit le *Cladothrix vaccinae* ; NAKANISHI (1912) [CXLIII] signale constamment dans la lymphe et tend à considérer comme spécifique le *Bacillus variabilis lymphæ vaccinalis*. RABINOVITCH (1911) a trouvé constamment dans les organes de sujets morts de la variole, ainsi que dans la lymphe vaccinale, un diplostreptocoque (Contribution à

l'étude de l'agent pathogène de la variole et de la vaccine. *Ann. des Sc. médic.*, janvier 1911). BELIN [XV] décrit au virus vaccinal une morphologie assez complexe et distingue : 1° des corpuscules ultra-microscopiques (qui mesurent moins de $1\ \mu$) ; 2° des corpuscules microscopiques (plus de $1\ \mu$) ; 3° des cellules souches dans l'intérieur desquelles on peut voir parfois des figures de segmentation ; 4° des flagelles qui peuvent se séparer et se déplacer seuls dans la préparation. Enfin, pour certains, l'agent de contagion du vaccin est un microbe invisible assez semblable à celui de la clavelée qui peut passer à travers la bougie Berkefeld, mais qui est retenu par la bougie Chamberland F.

L'importance de la question est bien démontrée par le nombre de ces travaux, et si nous essayons de tirer une conclusion des faits indiqués par ces auteurs, nous voyons que rien de certain n'est encore connu. L'hypothèse, qui serait donc encore permise, étant donné la fréquence de ces champignons dans la pulpe vaccinale et qui d'ailleurs a été plusieurs fois envisagée positivement (cf. HALLIER, BUIST, etc.), de levure comme agent spécifique, ne nous paraît pas cependant devoir être proposée.

Les inoculations faites au cobaye, spécialement celles par scarification vulvaire, ne nous ont pas donné de résultats (cf. p. 96).

Surtout, les recherches faites avec la lymphe recueillie dans les pustules d'enfants récemment vaccinés s'opposent à cette identification des levures étudiées plus haut au virus du vaccin. Nous avons récolté le produit des grosses pustules ouvertes, comme il s'en présente sou-

vent chez les enfants vaccinés pour la première fois, soit par raclage avec l'öse de platine, soit par aspiration au moyen d'une pipette stérilisée. Les ensemencements sur carotte, sur pomme de terre, sur gélose maltosée, n'ont donné que des *cocci*, parfois de courts bacilles, mais jamais de levures.

Réactions humorales

Nous avons également étudié le sang des lapins vaccinés. Imitant le procédé que Widal et Abrami ont préconisé pour la sporotrichose, nous avons essayé la sporo-agglutination. Avec le sang de lapin vacciné depuis 8 jours, la réaction a été complètement négative au 1/20, 1/50, 1/300, 1/500, en présence des dilutions faites dans le sérum physiologique des levures *Torula I* et *Mycoderma*. Faisons remarquer à ce sujet la nécessité de l'examen microscopique dans la recherche du pouvoir agglutinant d'un sérum lorsqu'il s'agit de champignons. Avec les levures, macroscopiquement, les tubes paraissent donner un résultat positif; si l'on examine un tube témoin, on s'aperçoit que partout il s'est formé un dépôt. Seul l'examen au microscope peut donc donner des résultats précis, et encore l'agglutination serait-elle moins nette chez certaines espèces dont les éléments sont plus ou moins groupés. Dans les formes étudiées ici (qui, lors de l'étude du sérum de lapins inoculés avec les levures *Torula I* et *Mycoderma* du vaccin, nous ont donné des résultats positifs au point de vue agglutination), formes le plus souvent isolées ou par chaînettes ne dépassant pas 2 ou 3 individus, l'aspect était très reconnaissable. On pouvait comparer cette agglutina-

tion à celle de l'Eberth, sauf, bien entendu, la mobilité des éléments.

L'hémoculture pratiquée sur pomme de terre et gélose maltosée a été négative. Des colonies de *cocci* sont apparues, mais il y avait absence complète de levures.

Le fait de la filtrabilité du virus, quoique récemment la question ait été remise en discussion (JULLIEN [CXVIII]) ferait aussi écarter l'hypothèse des levures comme virus du vaccin.

Il semble donc qu'il soit plus vraisemblable de ranger les levures du vaccin au nombre des saprophytes constamment trouvés dans la pulpe vaccinale, saprophytes qui jouent peut-être un rôle plus ou moins actif dans les phénomènes qui accompagnent la vaccination anti-variolique. Remarquons cependant que pour être affirmatif sur la question de ces rapports de la levure avec l'agent de contagé, il faudrait une série d'études complètes sur le singe, par exemple, études d'inoculation avec plusieurs passages successifs, exigeant un matériel qu'il est difficile de se procurer.

Il eût été intéressant de voir si l'étude de ces levures pouvait donner quelque renseignement sur la question des rapports de la variole et de la vaccine. Dans le cours des années 1912, 1913, il ne s'est produit à Lyon aucun cas de variole authentique et la recherche de levures n'a pu être faite chez des varioleux. D'ailleurs, nous n'avons pas trouvé d'auteurs signalant la présence de ces champignons dans la lymphe variolique. Seules quelques descriptions de protozoaires douteux offrent quelquefois certains rapprochements à faire avec des formes levures.

Origine possible de ces levures

Il restait à se demander, puisque nous écartons l'identité avec le virus, d'où proviennent ces champignons qui se trouvent si constamment dans la pulpe vaccinale animale.

La présence des microorganismes saprophytes de la pulpe vaccinale est expliquée ainsi par plusieurs auteurs : Microbes des poussières, des litières des étables, de l'air, parasites vivant sur les téguments ou à l'intérieur des téguments des animaux vaccinifères; la présence de levures dans la glycérine a été observée, mais nos observations montrent que le nombre des levures est aussi grand dans la lymphe fraîche que dans la pulpe glycélinée.

Tous les auteurs qui traitent la question des microbes de l'air ont signalé la présence de levures : MIQUEL et CAMBIER [CXLII], MIQUEL [CXLI], SARTORY et LANGLAIS [CLXVI *bis*], etc. La technique de la recherche des microbes dans l'air a suscité récemment l'intéressante communication de MM. G. BONNIER, MATRUCHOT et COMBES ¹, où ils indiquent la manière de récolter le « Plankton » aérien. Malheureusement, la difficulté des identifications ne permet pas de rapporter la plupart des formes mentionnées à des espèces ayant des caractères bien tranchés.

Signalons aussi que des levures (le plus souvent sans

1. G. BONNIER, L. MATRUCHOT et R. COMBES : Recherches sur la dissémination des germes microscopiques dans l'atmosphère. *C. R. Ac. des Sc.*, t. CLII, 13 mars 1911.

autre détermination) ont été signalées sur la peau des animaux et dans les pailles qui servent à confectionner les litières.

Cette dernière origine paraît, dans le cas particulier des levures de la pulpe vaccinale, pouvoir présenter quelque vraisemblance. L'origine aérienne peut aussi être envisagée avec cette réserve que les rayons solaires ont, d'après plusieurs auteurs, une action destructive très nette vis-à-vis d'un certain nombre de levures.

CHAPITRE II

LES LEVURES ET LA CONSERVATION DU VACCIN

La conservation de la pulpe virulente préoccupe tous les Instituts producteurs de vaccin. Malgré les bons résultats donnés par l'emploi de la glycérine, préconisé par COPEMAN, des reproches sont faits à ce procédé, et la recherche de produits ne présentant pas ses inconvénients a été entreprise depuis déjà plusieurs années. On a proposé l'acide phénique et le chloroforme. REPIN [CLIX], en 1910, recommande la glycérine dans laquelle ont macéré des champignons (*Russula emetica*, *R. delica*, *R. Queleti*), additionnée d'un centimètre cube de solution de tyrosine. Enfin, tout dernièrement, le Dr FRANK-BLAXALL [XXV bis], dans la *Revue internationale de la vaccine*, signale l'emploi de l'essence de girofle.

Nous avons essayé de rechercher l'action de la glycérine vis-à-vis des levures. D'abord, en étudiant la présence des quatre espèces isolées respectivement dans la pulpe fraîche et dans la pulpe glycinée. Les résultats obtenus, consignés dans le tableau suivant, montrent qu'il n'y a pas de changement, ce qui d'ailleurs était à prévoir, certaines levures (des Mycodermes surtout) végétant tout à fait bien sur les alcools et habitant normalement la glycérine.

Une autre série de nos recherches a porté sur des

cultures de levures soumises à l'action de la glycérine. Pour cela, le produit de raclage de colonies de levures était mélangé avec un volume d'eau stérilisée et deux volumes de glycérine. Après un contact de quelques heures, le milieu ayant été agité à plusieurs reprises, l'ensemencement était fait sur gélose, jus de carotte, et sur pomme de terre.

TABEAU 6

VACCINS	PULPES GLYCÉRINÉES				PULPES NON GLYCÉRINÉES			
	TORULA I	TORULA II	TORULA III	Mycoderma	TORULA I	TORULA II	TORULA III	Mycoderma
M ⁴ . . .	+	+		+	non examinée			
P ⁵ . . .	+				non examinée			
P ⁶ . . .	+	+			+	+		
M ⁷ . . .	+	+			+	+		
M. as. ⁸ .	+		+	+	+			
P ¹⁰ . . .								+
M ¹¹ . . .	+	+						
L ¹² . . .					+	+		
Laus. ¹³ .					+			
M ¹³ . . .					+	+		
P ¹³ . . .	+	+			+			+
M ¹⁴ . . .	non examinée				+			
M. as. ¹⁵ .	+	+	+		+		+	
Lapin ¹⁶ .	non examinée				+			
L ¹⁷ . . .	non examinée				+			
M. as. ¹⁸ .	non examinée				+	+		

Au bout de 20 à 25 heures, les quatre tranches de

pomme de terre se couvraient d'un bel enduit constitué par des colonies bien développées.

Les ensemencements sur gélose jus de carotte, mis au frigorifique à -5° , ont montré à l'examen microscopique que les levures s'y conservent vivantes, mais ne végètent pas. Macroscopiquement, une très mince couche grisâtre, à peine visible, occupe seule la surface ensemencée. Au microscope, les cellules des colonies développées sur pomme de terre étaient d'aspect normal.

Depuis quelque temps, on étudie aussi beaucoup l'action des basses températures dans la conservation du vaccin. Le Dr BORREL, un des premiers, puis FRANK-BLAXALL et FREMLIN, ont fait connaître que, après 6 mois et même 2 ans à -5° , la pulpe glycinée était dépouillée de ses germes adventices, sans aucun préjudice de son action spécifique. CAMUS [XLVIII bis] s'est aussi beaucoup occupé de cette question.

Nous avons soumis des cultures pures des quatre levures isolées à des températures variant de 0° à 14° (glacière et sous-sol du laboratoire) et à -5° C (température constante d'une salle frigorifique).

A 14° , les *Torula I* et *III*, la forme *Mycoderma* du vaccin poussaient bien; seule la *Torula II* végétait faiblement. La forme *Mycoderma* montrait une croissance abondante et rapide, s'accommodant beaucoup mieux de cette température que de celles dépassant 25° . Au voisinage de 0° , les levures, sauf *Torula II*, se sont comportées d'une manière semblable.

A -5° , les ensemencements sur gélose avec jus de carotte ont permis de constater que, sauf *Torula III*, qui végétait, très faiblement d'ailleurs, les formes exa-

minées conservaient leur vitalité, mais ne végétaient pas.

Le produit du raclage de la strie d'ensemencement a montré, pour *Torula I*, des cellules à membrane épaisse, avec des éléments en semelle ou plus ou moins déformés (examen après 15 jours).

La levure *Torula II du vaccin* avait formé à la surface du milieu un très faible enduit blanc grisâtre ; les éléments bourgeonnant souvent présentaient parfois un épaissement de la membrane.

Les cellules de *Torula III* étaient normales. Quant à la forme *Mycoderma*, plusieurs cellules étaient disposées en chaînette de 3 à 6 éléments, avec de temps en temps l'intercalation de cellules de plus grandes dimensions ressemblant à des formes de résistance.

Remarquons que ces dernières recherches demandent à être faites au moyen d'expériences de longue durée et que nous ne donnons ici qu'à titre d'indication les résultats que nous avons obtenus.

La question des levures dans ses rapports avec la conservation de la virulence a été déjà étudiée par Buist. De ses longues recherches, effectuées principalement sur des singes, cet auteur conclut à l'action favorisante des levures dans les réactions vaccinales : « J'en arrive à cette conclusion que l'inoculation de levures modifie d'une manière favorable l'action de la variole et de la vaccine » [XLII]. Malheureusement, pour les raisons données plus haut, ces recherches n'ont pas donné le résultat qu'on en attendait.

Reprises avec des cultures pures d'espèces soigneusement isolées, elles pourraient donner certainement d'utiles indications.

CHAPITRE III

ROLE PATHOGÈNE DES LEVURES DU VACCIN

Une des questions les plus importantes au point de vue pratique est celle qui préoccupe depuis longtemps les hygiénistes. Les microorganismes qui accompagnent le virus vaccinal, les espèces saprophytes de la pulpe, sont-ils pathogènes ?

Ce sujet est d'autant plus intéressant que le rôle pathogène de certaines levures est acquis. Nous mentionnerons seulement les cas d'ACHALME et TROISIER, NEUMAYER, LE DANTEC, MAGGIORA et GRADENIGO, BLANCHARD et BINOT, LEGRAIN, BUSSE, etc. ; les levures pathogènes (?) étudiées par LESIEUR, en collaboration avec GUILLIERMOND et BEAUVERIE. Il faut citer aussi les observations de MAFFUCCI et SIRLEO, KAHANE, SAN FELICE, CORSELLI et FRISCO, RONCALI, PLIMMER, et la théorie blastomycétienne du cancer. Sans insister sur ces dernières publications, mentionnons que la fréquence de ces découvertes a provoqué l'apparition de travaux qui étudient, d'un point de vue général, le rôle pathogène des levures. Pour le muguet, par exemple, la thèse de M^{lle} DAÏREUWA [LXXVI] ; les recherches de MACÉ [CXXXVI] pour les levures en général ; le travail de NESZADIMENKO [CXLIV], de FRANCHETTI [XCIII].

La réponse à la question du rôle pathogène possible

des microorganismes secondaires de la vaccine a été donnée par de nombreux auteurs : VOIGT, CHALYBÆUS, STUMPF ; FROSCH [XCIV] et KIRCHNER [CXXV] critiquent l'opinion de LANDMANN, qui prétend avoir isolé de nombreux staphylocoques pathogènes ; SACQUÉPÉE [CLXV], PIN [CLII] concluent à l'absence d'espèces pathogènes parmi les microorganismes du vaccin. Cependant, en 1894, LEONI, dans une communication retentissante au Congrès international de Rome, les accuse de réactions phlegmasiques dangereuses. Les affirmations de LÉONI ont été vivement combattues, et l'extrême rareté des affections secondaires dans la vaccination est venue renforcer les idées dont VAILLARD [CLXX], KELSCH [CXXIII], etc., se sont faits les défenseurs.

Il était nécessaire de rechercher avec soin si les levures nouvellement isolées pouvaient rendre nuisible l'emploi de la pulpe animale. Pour cela, nous avons pratiqué les inoculations suivantes : des cultures pures des deux premières levures isolées (parmi lesquelles se trouve *Torula I du vaccin*, la plus fréquente) ont été diluées dans le jus de carotte. Un lapin recevait une injection de 2^{cmc5} dans la veine marginale de l'oreille. Deux cobayes étaient ensuite inoculés : l'un par voie sous-cutanée (injection de 2 centim. cubes), l'autre par scarification au scalpel de la région vulvaire après quoi la dilution était largement répandue sur la surface ainsi traitée. Les observations répétées à peu près journellement n'ont montré aucun changement dans l'état de ces animaux. Un très léger suintement de la région vulvaire, observé chez une des femelles inoculées par scarification, disparut en un jour.

Quant aux deux autres levures plus tardivement isolées, elles furent inoculées seulement par injection sous-cutanée; elles n'ont produit aucune réaction ganglionnaire ni générale.

Nous avons aussi examiné le sang des animaux inoculés, d'abord au point de vue des propriétés du sérum. Le pouvoir agglutinant s'est montré assez faible. Un premier examen fait au bout de deux heures a donné, pour la levure *Torula I*, une agglutination nette (formation d'amas d'une vingtaine d'éléments) au 1/20. Deux heures après, l'agglutination avait apparu faiblement au 1/50; négative au bout de deux heures, pour les dilutions au 1/300 et 1/500, elle l'était encore après quatre : les cellules de la dilution témoin, examinées pour vérification à plusieurs reprises, se sont montrées constamment isolées ou groupées par deux ou trois seulement. Pour le sérum du lapin inoculé avec la levure *Mycoderma*, la réaction a été encore plus faible; deux heures après la mise en marche de l'opération, l'agglutination ne s'était effectuée dans aucun tube. Après quatre heures, l'examen a montré dans la dilution à 1/20 quelques rares petits amas de 4, 5 ou 6 individus au milieu de beaucoup de cellules isolées; au 1/50, aspect identique; rien au 1/300 et au 1/500.

La recherche faite du pouvoir agglutinant du sérum du lapin inoculé avec la levure *Mycoderma* par la dilution de *Torula I* a été négative à tous les taux. Il en a été de même pour l'action du sérum de lapin inoculé avec *Mycoderma du vaccin* vis-à-vis de la dilution de *Torula I*.

PINOY cite, dans l'article « Champignons du sang »

du traité publié sous la direction de GILBERT et WEINBERG [CLII *bis*], des formes levures qui végètent dans ce milieu. Nous avons recherché s'il en était de même pour les levures inoculées au lapin dans le sang circulant. L'hémoculture pratiquée dans ces deux cas a été très positive pour les deux formes; le sang du lapin inoculé avec la *Torula I* surtout a donné sur pomme de terre de belles colonies, ainsi que sur gélose maltosée. Avec la forme *Mycoderma*, les levures n'ont été retrouvées que sur tranche de pomme de terre. Cette dernière espèce d'ailleurs, ainsi que nous l'avons vu plus haut, pousse assez mal au-dessus de 25°.

Il nous semble permis de conclure, à la suite de ces diverses recherches, que les espèces de levures isolées de la lymphe vaccinale ne sont pas pathogènes et que, par conséquent, leur présence ne constitue aucun danger. Ceci concorderait avec l'opinion de plusieurs hygiénistes qui cherchent à démontrer que le nombre des microbes adventices dans le vaccin n'a pas une grande importance.

Restait à envisager la question de transmission possible de blastomycoses par le vaccin. On a signalé, en effet, plusieurs cas de mycoses post-vaccinales : rappelons brièvement ceux de PROTZE (1887), épidémie d'Eberfeld à *Trichophyton tonsurans* ; de BIDAULT [XXI], trichophytie à *T. microides* ; mais on n'a pas encore signalé, croyons-nous, de levures pathogènes transmises par la vaccination, et ceci vient confirmer nos recherches en montrant qu'il n'y a rien à craindre de ce côté.

Cependant la fréquence de ces champignons, le fait que des espèces du même groupe peuvent occasionner

des affections capables de venir compliquer assez gravement d'autres maladies (muguet surtout) mettent en évidence les soins d'asepsie qui doivent être observés dans les diverses opérations de l'obtention et de l'utilisation du vaccin : précautions dans les scarifications faites aux vaccinifères, propreté des étables, préparation rigoureusement aseptique de la pulpe, soins à prendre de la part de ceux qui manipulent le vaccin. (Voy. l'*Asepsie du vaccinateur*, par E. CHAUMIER. *Revue internat. de la vaccine*, n° 5, mars-avril 1913.) C'est à ce point de vue que l'examen des champignons nous paraît devoir remplir un rôle assez important dans le contrôle des vaccins, que la plupart des Instituts vaccino-gènes font actuellement avec grand soin pour les bactéries.

Ces recherches nous montrent aussi la nécessité des précautions d'asepsie dans la vaccination à l'homme et l'utilité de protéger les plaies vaccinales.

CONCLUSIONS



A

I. La présence de levures s'est montrée constante dans les pulpes vaccinales que nous avons examinées à l'Institut vaccinogène municipal de Lyon pendant deux mois : vingt-cinq échantillons de pulpes fraîches ou glycélinées âgées de moins de soixante jours.

II. Ces levures appartiennent à plusieurs espèces : des quatre formes isolées, trois, par leurs caractères morphologiques et biologiques, sont des *Torula*, une se rapproche des formes *Mycoderma*.

Une des *Torula* présente des formations zoogléliques que nous croyons non encore signalées dans la morphologie des levures.

B

III. Ces champignons existent aussi bien dans la pulpe glycélinée (âgée de moins de quatre à cinq mois) que dans la pulpe fraîchement recueillie.

IV. Leur recherche dans des pulpes vaccinales recueillies depuis cinq ou six mois, conservées à basse température, entre 0° et + 10° C., nous a donné des résultats négatifs.

V. Les basses températures ne sont pas défavorables à la croissance des levures du vaccin.

C

VI. Des quatre espèces de levures isolées par nous, aucune ne s'est montrée pathogène pour le cobaye et le lapin. Aucune n'a été rencontrée chez l'enfant vacciné.

VII. Des recherches faites sur le sang des animaux inoculés avec ces levures, il résulte que le pouvoir agglutinant de leur sérum se montre très faible.

Les levures inoculées ont été retrouvées par hémoculture du sang du lapin.

VIII. L'analyse mycologique du vaccin paraît, dans certains cas, pouvoir présenter un intérêt au point de vue de la prophylaxie d'accidents possibles : il paraît surtout important de déterminer si les champignons observés sont saprophytes ou pathogènes.

VU :

Le Président de la thèse,

Ch. LESIEUR.

VU :

Le Doyen,

L. HUGOUNENQ.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Lyon, le 12 juin 1913.

Le Recteur, Président du Conseil de l'Université,

P. JOUBIN.

BIBLIOGRAPHIE ¹



- I. ABRAMI (P.). — Voy. Widal.
I bis. ANTONY. — Vaccine et variole. *Bull. médical*, 1896.
II. ARLOING. — Les Virus. Paris, Alcan, 1891.
II bis. BABÈS. — Voy. Cornil.
III. BARD et LECLERC. — De la réceptivité du lapin pour la vaccine. *Gaz. hebdom. de Méd.*, Paris, 1891.
IV. BARY (A. DE). — Ueber Schimmel u. Hefe: *Sammlung gemeinverst. wissenschaft. Vorträge von Virchow u. v. Holzendorff*. Heft 87 u. 88.
V. BARY (A. DE). — Vergleichende Morphologie u. Biologie der Pilze, Mycetozoen u. Bakterien. Leipzig, 1884.
VI. BAUMGARTEN (P.). — Lehrbuch der pathologische Mykologie. Braunschweig, 1890.
VII. BAY (J. Chr.). — The spore forming species of the genus Saccharomyces. *The american naturalist*, t. XXVII, 1893.
VIII. BAY (J. Chr.). — Investigations concerning the Etiologie of small-pox. *Philadelph. medic. News*, 1895.
IX. BEAUVERIE (J.). — Études sur le polymorphisme des champignons. Influence du milieu. *Thèse doctorat ès sciences, Annales de l'Université de Lyon*, Paris et Lyon, 1900.
X. BEAUVERIE (J.). — Les méthodes de la biométrie appliquées à l'étude des levures. *C. R. de la Soc. de Biol.*, février 1912.
XI. BEAUVERIE (J.) et LESIEUR. — Étude de quelques levures

1. L'étude proprement dite des levures de la pulpe vaccinale comporte très peu de références bibliographiques, mais les diverses questions qui s'y rapportent nous ont fait citer un certain nombre d'ouvrages dont il était utile de donner la provenance.

Voici les numéros des auteurs qui ont spécialement décrit des levures dans le vaccin : CXIII, HALLIER et ZURN ; CXIII bis, HALLIER ; CXXI, KEBER ; CLXVIII, TENHOLT ; CXLVIII et CL, L. PFEIFFER ; XLII et XLIII, BUIST.

- rencontrées chez l'homme dans certains exsudats pathologiques. *Journal de Physiologie et de Pathologie générale*, t. XIV, n° 5, septembre 1912.
- XII. BÉCLÈRE, CHAMBON et MÉNARD. — Études sur l'immunité vaccinale. *Annales de l'Institut Pasteur*, n° 12, 1898, et t. XIII, 1899.
- XIII. BELIN. — Des réactions vaccinales de la cornée. *Revue internationale de la Vaccine*, année 1, n° 1, 1910.
- XIV. BELIN. — L'état actuel de la science sur la variolo-vaccine. *Revue internationale de la Vaccine*.
- XV. BELIN. — Un procédé de culture in vivo, permettant de déterminer la morphologie du virus vaccinal. *Revue internationale de la Vaccine*, année 2, n° 2.
- XVI. BERTARELLI. — Le micosi e la lora sistematica. *Riv. di igiene e di sanita publ.*, anno 21, 1910, n° 23.
- XVII. BETHE. — Ueber pathogene Hefe, *Dissert.*, Greifswald, 1899.
- XVIII. BEURMANN (H. DE) et GOUGEROT (H.). — Les mycoses, in *Nouveau traité de médecine et de thérapeutique* de Brouardel et Gilbert, t. IV.
- XIX. BEURMANN (H. DE) et GOUGEROT (H.). — Les exoascoses. *Bull. et Mém. de la Soc. médicale des Hôpitaux de Paris*, 1909, et *Tribune médicale*, 1909.
- XX. BEURMANN (H. DE) et GOUGEROT (H.). — Les nouvelles mycoses, *Encyclopédie des Aide-mémoire*, Gauthier-Villars, Paris, 1911.
- XXI. BIDAULT (C.). — Trichophytie cutanée occasionnée par le vaccin de génisse. *Rev. internat. de la Vaccine*, 2^e année, n° 4, 1912.
- XXII. BINAGHI (Roberto). — Ueber das Vorkommen von Blastomyceten in den Epitheliomen und ihre parasitäre Bedeutung. *Zeitschrift f. Hyg. u. Infekt.*, 1896, vol. 23.
- XXIII. BINOT. — Levures pathogènes, dans *Précis de Microbie* de Thoinot et Masselin. Masson, Paris, 1902.
- XXIII bis. BINOT, voy. Blanchard.
- XXIV. BLANCHARD (R.). — Maladies parasitaires, parasites animaux, parasites végétaux à l'exclusion des bactéries. *Traité de pathologie générale* de Bouchard, I, II, Paris, 1895.
- XXV. BLANCHARD, SCHWARTZ et BINOT. — Un cas de blastomycose intrapéritonéale. *Arch. de Parasitologie*, VII, 1903, et *Bull. Acad. Médec.*, 30 mars 1903.
- XXV bis. BLAXALL (Frank R.). — De l'emploi de l'essence

- de girofle dans la préparation du vaccin de génisse glycérociné. *Rev. internat. de la Vaccine*, n° 5, 1913.
- XXVI. BODIN. — Les champignons parasites de l'homme. *Encycl. scient. des Aid.-mém. Léauté*, Paris.
- XXVII. BODIN et SAVOURÉ. — Recherches expérimentales sur les mycoses internes. *Arch. de Parasitologie*, VIII.
- XXVIII. BOISSON (médecin principal). — Rapport annuel sur le service vaccinal, 1905.
- XXIX. BORMANS (A.). — I corpuscoli mobili del Volpino nel vacuolo del cavallo (horsepox). *Giornale della R. Accademia di Medicina di Torino*, 1909, n°s 6-8.
- XXX. BORREL. — Epithéliose vaccinale. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1903.
- XXXI. BOSC. — Les maladies à Sporozoaires. *Arch. de Méd. expérimentale*, 1901.
- XXXII. BOSC (F.-J.) et MUSSO. — Parasites de la vaccine. *IV^e Congrès français de Médecine*, Montpellier, 1898.
- XXXIII. BOUCHARD (Ch.) et ROGER. — Nouveau traité de Pathologie générale. Paris, Masson, 1912.
- XXXIV. BOUREAU et CHAUMIER. — Les microbes du vaccin. *Bull. méd.*, 1896.
- XXXV. BRAIDWOOD. — The morphology of vaccine lymph. Manchester, 1872.
- XXXVI. BRAUN (M.). — Die thierischen Parasiten des Menschen, II Aufl., Wurtzburg, 1895.
- XXXVII. BRAUN a. LULE. — Handbook of practical Parasitology, transl. by Forster, London, 1910.
- XXXVII bis. BREFELD (O.). — Botanische Untersuchungen über Schimmelpilze, 1881, H. 4, *Hefepilze*, u. 1883, H. 5.
- XXXIX. BRIDRÉ, NÈGRE et TROUETTE. — Recherches sur la lymphangite épizootique en Algérie. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, t. XXVI, 1912.
- XL. BROU. — De l'immunité vaccinale et de la nécessité des revaccinations chez le vieillard, *Thèse de Méd.*, Paris, 1896-1897.
- XLI. BROUARDEL et MOSNY. — *Traité d'Hygiène*, publié sous la direction de MM. Chantemesse et Mosny. Paris, Bailliére, 1912.
- XLII. BUIST (John B.). — The composition and action of natural and cultivated vaccine and variolous materials. *The Practitioner*, old series, vol. LVI; new series, vol. III, 1896.
- XLIII. BUIST (John B.). — Vaccinia and Variola, J. and A. Churchill, 1887.

- XLIV. BUSSE. — Ueber Saccharomycosis hominis. *Virchow's Archiv*, CXL, p. 25, 1895.
- XLV. BUSSE. — Ueber pathogene Hefe u. Schimmelpilze. *Ergebnisse der Allgem. Pathol. d. Menschen u. Thiere*, V, 1898, Wiesbaden, 1900.
- XLVI. BUTTERSACK. — *Deutsche med. Wochenschr.*, n° 51, 1893. Voy. aussi : *Gesellschaft der Charitéärzte*, Sitzung am 15 dec. 1893.
- XLVII. Les microbes de la variole et de la vaccine, *Bull. méd.*, 1894.
- XLVII bis. CAMBIER. — Voy. Miquel.
- XLVIII. CAMUS (L.). — De l'inoculation des vaccinifères. *Journal de Physiol. et de Pathol. gén.*, t. XIV, n° 3, 1912.
- XLVIII bis. CAMUS (L.). — De l'utilisation des basses températures dans les Instituts vaccino-gènes, etc. *Journal de Physiol. et de Pathol. générale*, 1911, n° 3.
- XLIX. CAMUS (L.). — Comment avoir du vaccin pur et actif, vaccin glycérimé et vaccin sec. *Paris médical*, 2 nov. 1912.
- XLIX bis. CAMUS. — Voy. Kelsch.
- L. CASAGRANDE (O.). — Ueber die Morphologie der Blastomyceten. *Centralbl. f. Bakt.*, t. III, 1897.
- LI. CASAGRANDE (O.). — Su alcune questioni relative all'immunità antivaccinale ottenuta col vaccino filtrato attraverso le Berkefeld W. *Ann. d'Igiene speriment.*, vol. XIX, 1909.
- LII. CASAGRANDE (O.). — Sui metodi per mettere in evidenza il virus vaccino e vailoso nelle cellule corneali per mezzo di preparati colorati. *Boll. de Soc. Scienz. med. e natur. Cagliari*, 2 april 1910.
- LIII. CASAGRANDE (O.). — Sulla coltivabilità del virus vaccino nei leucociti. *Boll. de Soc. Scienz. med. e natur. Cagliari*, 16 april 1910.
- LIV. CASAGRANDE (O.). — Zur Aetiologie der Menschenpocken. *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. 1, Orig. Bd 57, 1911.
- LV. CERBELAUD et BAYARD. — Manuel clinique d'analyses bactériologiques.
- LVI. CHARRIN et OSTROWSKY. — L'*Oidium albicans*, agent pathogène. Pathogénie des désordres morbides. *C. R. de l'Ac. des Sciences*, CXX, 1895.
- LVI bis. CHAUMIER. — Voy. Boureau.
- LVII. CHAUVEAU (A.). — Nature des virus. *C. R. de l'Acad. des Sciences*, 1868.

- LVIII. CHAUVEAU (A.). — Nature du virus vaccinal. *Journal de Médec. vétérinaire de Lyon*, 1868, n° 3.
- LIX. CHAUVEAU (A.). — Recherches expérimentales sur les éléments du principe actif dans la sérosité du virus vaccinal. *Gazette médic. de Paris*, 1868, n° 10.
- LX. CLARKE (J. J.). — A note on variola and vaccine. *Transactions of the pathological Society of London*, 1895.
- LXI. CLARKE (J. J.). — Einige Bemerkungen über die Morphologie der Sporozoen von Variola, sowie über die Pathologie der Syphilis. *Ctralbl. f. Bakt.*, 1895, Bd XVII.
- LXII. CLARKE (J. J.). — The sporozoa of variola and vaccinia. *The Lancet*, 1895, I.
- LXIII. COHN. — Organismen in der Pockenlymphe. *Virchow's Archiv*, t. LV, 1872.
- LXIV. COHN. — Ueber die virulenten Bestandtheile der Vaccineflüssigkeit. *Voy. Bullet. de l'Acad. de Méd.*, 1868, t. XXXIII.
- LXIV bis. CONVENT. — Voy. Henseval.
- LXV. COPEMAN. — The bacteriology of vaccine lymph. *Med. Press and Circ. London*, N. S., 1892, vol. XIII.
- LXVI. COPEMAN. — Small-pox and vaccina : their manifestations and inter-relations in man and the lower animals. *The Practitioner*, 1896, I.
- LXVII. COPEMAN. — Vaccination : its natural history and pathology. London, Macmillan, 1899. — Voy. aussi : *Trans. International Congress of Hygiene*, London, 1891. — *Proc. Royal Society*, June, 1893. — *Journ. of Pathology and Bacteriology*, May, 1894. *Brit. Med. Journal*, Jan. 1896.
- LXVIII. CORNIL et BABÈS. — Note sur le siège des bactéries dans la variole, la vaccine, l'érysipèle. *Union médic.*, 1884.
- LXIX. CORNIL et RANVIER. — Manuel d'histologie pathologique.
- LXX. COSTA (S.). — Sur la présence d'un blastomycète dans le sang des rougeoleux. *Réunion biol. de Marseille, C. R. de la Soc. de Biol.*, LXXIII, 17 déc. 1912.
- LXXI. COSTANTIN. — Sur les levures des animaux. *Bull. de la Soc. myc. de France*, t. XVII, 1901.
- LXXII. COURMONT (J.). — Précis de Bactériologie. *Collection Testut*, Paris, Doin.
- LXXIII. COZETTE. — Voy. Delobel.
- LXXIV. CRUICKSHANK (Robert W.). — A note on cow-pox in man. *British med. Journ.*, 1910, n° 2573. — Voy. aussi : *Transaction Internat. Congress of Hygiene*, London, 1891.

- LXXV. DAHM. — Serologische Untersuchungen bei der Variola vera. *Ctralbl. f. Bakt. u. Parasitenkunde*, Bd LI, Abt. 1, 1909.
- LXXVI. DAÏREUWA (M. P.). — Rech. sur le champignon du muguet et son pouvoir pathogène, *Thèse de Méd.*, Nancy, 1898-1899.
- LXXVII. DANTEC (LE). — Étude bactériologique de la variole. *Presse médicale*, 1894.
- LXXVIII. DANTEC (LE). — Microbes secondaires de la vaccine. *Bull. médical*, 1895.
- LXXIX. DANTEC (LE). — Mycodermose intestinale dans divers états pathologiques. *Gaz. hebdom. des Sc. méd. de Bordeaux*, n° 7, 1913.
- LXXX. DARIER. — Vaccins, sérums et ferments dans la pratique journalière. Paris, Doin.
- LXXXI. DAUTÉE. — Les microbes secondaires de la vaccine. *Gaz. médic. de Paris*, 1895, n° 45.
- LXXXII. DEBENEDETTI (A.). — Contribution à l'étude de la spécificité des corpuscules mobiles du vaccin. *Revue internat. de la vaccine*, année 1, 1911, n° 2.
- LXXXIII. DEELEMANN. — Ueber den Bakteriengehalt der Schutzpockenlymphe. *Arb. aus dem bakt. Inst. d. techn. Hochschule zu Karlsruhe*, II, 1898.
- LXXXIV. DELOBEL et COZETTE. — La Vaccine. *Encycl. des Aide-Mém. Léauté*, Paris, Masson, Gauthier-Villars.
- LXXXV. DOP et GAUTHIER. — Manuel de Technique botanique ; histologie et microbiologie végétales. Rudeval, Paris, 1908.
- LXXXVI. DRAEL (A.). — Sur l'organisme décrit dans la vaccine par Buttersack. *Ctralbl. f. Bakt.*, oct. 1894.
- LXXXVII. DUCLAUX (E.). — Traité de Microbiologie. Fermentation alcoolique, t. III. Paris, Masson, 1900.
- LXXXVIII. RUBENS-DUVAL et LÆDERICH. — Contribution à l'étude des Blastomycoses. *Arch. de Parasitol.*, t. XIV, 1910.
- LXXXIX. DUVOIR. — Étude sur la variolo-vaccine, Paris, 1910-1911.
- LXXXIX bis. DUVOIR. — Voy. Tanon.
- LXXXIX ter. DUVOIR. — Voy. Teissier.
- XC. EISELT dans *Prager Vierteljahreschrift*, 1863, vol. I.
- XCI. ELIACHEFF (M^{me} P.). — Agent spécifique du vaccin. *Médecine moderne*, 10 oct. 1896.
- XCII. FERRONI et MASSARI. — Nota preliminare sul preteso

- parasita dell' infezione vaccinale e vajolica. *Riforma medica*, n° 51, VII, 1893.
- XCIII. FRANCHETTI (A.). — Ricerche sui blastomiceti patogeni. *Lo sperimentale*, anno 64, 1910.
- XCIV. FROSCHE (P.). — Bericht über die Thätigkeit der von dem Herrn Minister der Geistlichen, Unterrichts und Medicinal-Angelegenheiten eingesetzten Commission zur Prüfung der Impfstofffrage, Berlin, 1896.
- XCV. FUNCK. — L'agent étiologique de la vaccine et de la variole. *Semaine médicale*, 20 février 1901.
- XCVI. GALLI-VALERIO (Bruno). — Affections varioleuses, état actuel des études sur les rapports qui existent entre elles. *Centralblatt f. Bakt.*, I Abt., XXV Bd, 1899.
- XCVII. GARRÉ. — Ueber Vaccina u. Variola. *Deutsche medic. Wochenschrift*, 1887, n° 12-13.
- XCVIII. GASTOU. — Blastomycoses. *Annales de Dermatologie*, n° 2, 1903.
- XCVIII bis. GAUTHIER. — Voy. Dop.
- XCIX. GEDOELST (L.). — Les champignons parasites de l'homme et des animaux domestiques. Liège, Bruxelles, 1902.
- C. GILKINET. — Recherches sur le sort des levures dans l'organisme. *Archives de Médecine expérimentale*, 1897.
- CI. GORODKOWA (A.). — Ueber das Verfahren rasch die Sporen von Hefepilzen zugewinnen. *Bull. Jard. Imp. bot. Petersbourg*, t. VIII, 1908.
- CI bis. GOUGEROT. — Voir de Beurmann.
- CII. GUARNIERI (G.). — Ricerche sulla patogenesi dell' infezione vaccinica e variolosa. *Archivio per le Scienze mediche*, 1892, vol. XVI, n° 22.
- CIII. GUEGUEN (F.). — Les champignons parasites de l'homme et des animaux. *Thèse d'Agrégation*, 1904.
- CIV. GUEGUEN (F.). — Voir Lutz.
- CV. GUIART (J.). — *Précis de Parasitologie*, Paris, Baillière, 1910.
- CVI. GUILLIERMOND (A.). — Recherches sur la structure de quelques champignons inférieurs. *C. R. Ac. d. Sc.*, t. CXXXIII, 1901.
- CVII. GUILLIERMOND (A.). — Recherches cytologiques sur les levures et quelques moisissures à forme levures. *Thèse de doctorat*, Lyon, 1902.
- CVIII. GUILLIERMOND (A.). — L'origine des levures. *Annales Mycologici*, t. V, 1907.

- CIX. GUILLIERMOND (A.). — Nouvelles recherches sur la cytologie des levures. *C. R. Ac. des Sc.*, t. CI, 1910.
- CX. GUILLIERMOND (A.). — A propos des corpuscules métachromatiques ou grains de volutine. *Arch. f. Protistenkunde*, t. XIX, 1910.
- CXI. GUILLIERMOND (A.). — Les Levures. *Encyclop. scientif. du Dr Toulouse*, Doin, Paris, 1912.
- CXII. GUILLIERMOND et LESIEUR. — Sur une levure nouvelle, isolée de crachats humains, au cours d'un cancer secondaire du poumon. *C. R. Soc. biol.*, LXX, juin 1911.
- CXIII. HALLIER et ZURN. — Notiz über die Auffindung pflanzlicher Organismen in den Schafpocken. *Virchow's Archiv*, Bd XLI, 1867.
- CXIII bis. HALLIER (E.). — Notiz über Hefebildungen in der Lymphe der Menschenblättern. *Virchow's Archiv*, Bd XLII, 1868.
- CXIV. HANSEN (E. Chr.). — Recherches sur des organismes qui, à différentes époques de l'année, se trouvent dans l'air à Carlsberg et aux alentours, et qui peuvent se développer dans le moût de bière. *C. R. du labor. de Carlsberg*, t. 1^{er}, livr. 4, 1882.
- CXV. HANSEN (E. Chr.). — Sur les *Torula* de M. Pasteur. *C. R. du labor. de Carlsberg*, t. 1^{er}, livr. 2, 1885.
- CXVI. HARTER. — Blastomycose généralisée. *C. R. Soc. de Biologie*, 1908.
- CXVI bis. HENSEVAL et CONVENT. — Recherches sur l'immunité vaccinale. Étude des propriétés du sérum des animaux vaccinés. *Rev. int. de la Vaccine*, n° 1, 1912.
- CXVII. ISHIGAMI. — Ueber die Kultur des Vaccine-Variolaerregers, *Ctraltblatt f. Bakt.*, XXXI, 1902.
- CXVIII. JULLIEN. — Quelques recherches sur la filtrabilité du virus-vaccin. *Journal de Physiologie et Pathologie gén.*, n° 5, sept. 1910.
- CXIX. KAHANE. — Présence d'une levure dans les cancers. *Semaine médicale*, XV, 1895.
- CXX. KAYSER. — Les levures. Paris, Masson, 1905.
- CXXI. KEBER. — Ueber die microscopischen Bestandtheile der Pockenlymphe. *Virchow's Archiv*, Bd XLII, 1868.
- CXXII. KELSCH. — Article *Vaccine* du *Traité d'Hygiène* de Brouardel et Mosny.
- CXXIII. KELSCH. — Rapport sur le service vaccinal en France et aux colonies pendant l'année 1904.
- CXXIV. KELSCH, CAMUS et TANON. — Pulpes vaccinales et

basses températures. *Bull. Ac. de Méd.*, séance du 12 juillet 1910.

CXXIV bis. KENT. — The virus of vaccinia and its cultivation, *Lancet*, 21 mai 1898.

CXXIV ter. KLEBS. — *Arch. f. experim. Patholog.*, t. X.

CXXV. KIRCHNER. — Ueber den Keimgehalt animaler Lymphe. *Zeitschrift f. Hygiene u. Infectiouskrank.*, Bd XXIV, 1897.

CXXVI. KOLLE. — Handbuch der pathogenen Mikroorganismen.

CXXVII. KOLLE et HETSCH. — La Bactériologie expérimentale, trd. par H. Carrière. Paris, Doin, 1910.

CXXVIII. KOURLOFF. — Les microorganismes du vaccin. *Archives russes de Pathologie et de Bactériologie*. Octobre 1896.

CXXIX. KUSTER (E.). — Kultur der Mikroorganismen. G. Teubner, Leipzig-Berlin, 1907.

CXXX. LANDMANN. — Ueber reine animale Lymphe. *Hygienische Rundschau*. VI Jahr. 1895.

CXXX bis. LANGLAIS. — Voy. Sartory.

CXXXI. LAYET. — Vaccine et Variole. *Bulletin médical*, 1895.

CXXXII. LEMOINE. — Contribution à l'étude bactériologique de la pulpe vaccinale glycerinée. *Revue d'Hygiène*, 1897.

CXXXIII. LEONI (O.). — Sui fattori dell' attività specifica e pattogena del vaccino. *Rivista d'Igiene e sanità pubblica*, agosto 1890.

CXXXIV. LEONI (O.). — Sulla scoperta del modo di rendere bacterio logicamente puro il vaccino animale, e sui vantaggi da questa scoperta derivati alla pratica della vaccinazione. *Rivista d'Igiene e sanità pubblica*, sett. 1896.

CXXXIV bis. LESIEUR. — Cf. Beauverie ; Guilliermond.

LESIEUR et L. MAGNIN. — C. R. Soc. Biol. (en préparation).

LESIEUR et L. MAGNIN. — Journal de Physiologie et de Pathologie générale (article en préparation).

CXXXV. LUTZ et GUEGUEN. — De l'unification des méthodes de culture des Mucédinées et des Levures. *Actes du Congrès international de Botanique* de 1900, et *Bull. de la Soc. mycol. de France*, 1901.

CXXXVI. MACÉ (Ch.). — Étude sur les mycoses expérimentales. *Thèse Médec.*, Paris, 1893.

CXXXVII. MACÉ (Ch.). — Traité de Bactériologie, Baillière, Paris, 5^e édit., 1904.

- CXXXVIII. MAFFUCCI et SIRLEO. — Beobachtungen u. Versuche über einen pathogenen Blastomyceten bei Einschluss desselben in die Zellen der pathologischen Gewebe. *Ctralbl. f. allg. Pathologie u. pathol. Anatomie*, VI, 1895.
- CXXXIX. MAGNIN (A.). — Les Bactéries. *Thèse d'Agrégation*. Paris, Savy, 1878.
- CXXXIX bis. MAGNIN (A.) and STERNBERG. — Bacteria, Will. Wood and Co, New York, 1884.
- CXL. MAGNIN (A.). — Cours de la Fac. des Sc. de Besançon sur les champignons, particulièrement celui de l'année 1903-1904.
- MAGNIN (L.). — Voy. Lesieur et Soc. Hist. nat. du Doubs, 1913.
- CXL bis. MASSARI. — Voy. Ferroni.
- CXLI. MIQUEL (P.). — Les Organismes vivants dans l'atmosphère. Paris, 1883.
- CXLII. MIQUEL et CAMBIER. — Traité de Bactériologie pure et appliquée à la médecine et à l'hygiène. Paris, 1902.
- CXLII bis. MUSSO. — Recherches sur les parasites de la vaccine. *Thèse de Méd.*, Montpellier, 1897-1898.
- CXLIII. NAKANISHI. — *Bacillus variabilis lymphæ vaccinalis*, ein neuer, konstant in Vaccinepusteln vorkommender Bacillus. *Ctralblatt f. Bakt.*, XXVII, 1900.
- CXLIV. NESZADIMENKO. — Zur Pathogenese der Blastomyceten. *Ctralblatt f. Bakt.*, XXV, 1899.
- CXLV. OGATA. — Ueber die Sporozoa der Vaccinelymphe und deren Bedeutung für die Krankheit. *Mittheilungen der Medicin. Fakultät der kaiserl. Japanischen Universität*. Tokio, Bd III, Heft 2.
- CXLVI. PASCHEN. — Ueber den Variola und Vaccineerreger. *Vortrag bei d. Vers. d. Vorstände der deutschen Impfsanstalten. Hygien. Rundschau*, 1912, n° 6.
- CXLVII. PFEIFFER (E.). — Ueber die Züchtung des Vaccineerregers in dem Corneaepithel des Kaninchens, Meerschweinches und Kalbes. *Ctralblatt. f. Bakt.*, Bd XVIII, n° 25, 1895.
- CXLVIII. PFEIFFER (L.). — Ueber Sprosspilze in der Kalberlymphe. *Correspondenzbl. des allg. ärztlichen Vereins von Thüringen*, 1885, n° 3.
- CXLIX. PFEIFFER (L.). — Ein neuer Parasit des Pockenprocesses aus der Classe der Sporozoa. *Monatshefte f. prakt. Dermatologie*, mai 1887.
- CL. PFEIFFER (L.). — Die bisheringen Versuche zur Rein-

- zuchtung des Vaccinecontagium und die antiseptik der Kuhpockensimpfung. *Zeitschrift f. Hygiene*, 1888.
- CLI. PFEIFFER (L.). — Die neueren, seit 1887, vorgenommenen Versuche zur Reinzuchtung des Vaccinecontagium. *Zeitschrift f. Hygiene u. Infect.*, Bd 23, 1896.
- CLII. PIN. — Contribution à l'étude de l'agent spécifique du vaccin. *Thèse de Méd.*, Bordeaux, année 1898-1899.
- CLII bis. PINOY. — Art. *Champignons du Sang* dans le *Traité du Sang*, publié sous la direction de Gilbert et Weinberg. Paris, Baillière, 1913.
- CLIII. PROCA (G.). — Essais de culture du microorganisme de la vaccine. *C. R. Soc. de Biol.*, 1910, t. I^{er}.
- CLIV. PROWAZEK (VON). — Ueber Vaccine u. Variola, in *Handbuch der pathogenen Protozoen*, Lief. 2.
- CLV. PROWAZEK (VON). — Weitere Untersuchungen über das Vaccinevirus. *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Bd Orig. 56, 1910.
- CLVI. QUIST. — Die künstliche Züchtung des Kuhpockenimpfstoffs. *Berlin. Klin. Wochenschrift*, 1885.
- CLVIII. RENAUT. — Nouvelles recherches anatomiques sur la prépustration et la pustulation varioliques. *Annales de Dermatologie et de Syphiligraphie*, 1881.
- CLIX. REPIN. — Un procédé de conservation du vaccin. *Bull. de la Soc. de Pathol. exotique*, t. III, 1910.
- CLX. ROCHAIX (A.). — Nouveau milieu végétal pour cultures microbiennes. *C. R. des séances de la Soc. de biol.*, 15 mars 1913, t. LXXIV.
- CLX bis. ROCHAIX. — Voir Roux.
- CLXI. ROSENAU. — Vaccine virus. *Journ. of the Americ. Med. Assoc.*, vol. LIV, 1910, n° 4.
- CLXII. ROUX (G.) et LINOSSIER. — Sur la mycose expérimentale due au champignon du muguet. *Lyon médical*, 1899.
- CLXIII. ROUX et ROCHAIX. — Précis de microbie et de technique bactérioscopique. *Bibliothèque de l'Etudiant en Pharmacie*, 1911.
- CLXIV. RUETE (Ad.) et ENOCH (C.). — Ueber Vaccinereinculture und über das Toxin « Vaccinin ». *Deut. Medic. Wochens.*, n° 23, 1893.
- CLXIV bis. SABRAZÈS et JOLY. — Sur un nouveau *Streptothrix* fréquemment isolé du vaccin de génisse. *C. R. Soc. de biol.*, 29 janv. 1898.
- CLXV. SACQUÉPÉE. — Étude sur la flore bactérienne du vaccin. *Thèse de Lyon (Méd.)*, année 1896-1897.

- CLXVI. SALMON. — Recherches sur l'infection dans la vaccine et la variole. *Annales de l'Inst. Pasteur*, 1897.
- CLXVI bis. SARTORY et LANGLAIS. — Poussières et Microbes de l'air. Poinat, Paris, 1912.
- CLXVII. SIEGEL. — Gelungene Reinkultur des Cytorrhycles vaccinæ. *Citratbl. f. Bakt.*, Bd LIX, I Abt. Orig., 1911.
- CLXVIII. TENHOLT. — Die Bacterien der Kälberlymphe. *Correspond. d. allg. ärztl. Vereins von Thüringen*, 1887, n° 6.
- CLXIX. THOINOT et MASSEIN. — Précis de Microbie, Masson, Paris, 1902.
- CLXX. VAILLARD. — *Archives générales de Méd. militaire*, 1901, t. XXXVIII.
- CLXXI. VEDELER. — Vaccineprotozoen. *Mag. f. Loeger*, 1896, n° 5, Christiania.
- CLXXII. VOIGT. — Impfschutz u. Variolovaccine. *Deut. Medic. Wochenschrift*, n° 32, 1898.
- CLXXIII. VOLPINO. — A propos des corpuscules mobiles de la vaccine. *Rev. internat. de la Vaccine*, II, 1912, n° 4.
- CLXXIV. VÖLTZ, WILHELM u. BAUDREXEL. — Die Verwertung der Hefe im menschlichen Organismus. *Biochem. Zeitschr.*, Bd XXX, 1911.
- CLXXV. VUILLEMIN (P.). — Les blastomycètes pathogènes. *Rev. gén. d. Sc.*, n° 16, 12^e année, t. XII, 1901.
- CLXXVI. VUILLEMIN (P.). — Les champignons; Essai de classification. *Encyclopédie scientif.* Doin, Paris, 1912.
- CLXXVII. WIDAL (F.) et ABRAMI (P.). — Sero-diagnostic de la sporotrichose par la sporo-agglutination. Sa réaction de fixation. *Bull. de la Soc. Méd. des Hôp. de Paris*.
-

TABLE DES MATIÈRES



INTRODUCTION.	5
-----------------------	---

PREMIÈRE PARTIE

Historique et méthodes d'observation

CHAPITRE PREMIER. — <i>Historique de l'étude des levures du vaccin</i>	9
CHAP. II. — <i>Origine des vaccins étudiés et méthodes d'observation</i>	17
Technique employée pour l'étude botanique	20

DEUXIÈME PARTIE

Description des levures

CHAP. I. — <i>Torula I du vaccin</i>	25
Caractères morphologiques	25
Figure 1	26
Figure 2	29
Propriétés biologiques	34
CHAP. II. — <i>Torula II du vaccin.</i>	37
Caractères morphologiques	37
Figure 3	38
Figure 4	40
Propriétés biologiques	46
CHAP. III. — <i>Torula III du vaccin</i>	48
Caractères morphologiques	48
Figure 5	49
Figure 6	51
Propriétés biologiques	56
Figure 7	57
Graphique.	58

CHAP. IV. — <i>Mycoderma du vaccin</i>	59
Caractères morphologiques	59
Figure 8	60
Figure 9	61
Figure 10	64
Figures 11 et 12.	66
Propriétés biologiques	70
CHAP. V. — <i>Tableaux récapitulatifs</i>	73
Levure <i>Torula I</i>	73
Levure <i>Torula II</i>	74
Levure <i>Torula III</i>	75
Levure <i>Mycoderma</i>	76
Fréquence des levures dans la pulpe vaccinale	77
Autres microorganismes observés	78

TROISIÈME PARTIE

Rôle des levures

CHAP. I. — Les levures et le virus vaccinal.	83
Réactions humorales.	87
Origine	89
CHAP. II. — Les levures et la conservation du vaccin.	91
Tableau 6.	92
CHAP. III. — Le rôle pathogène des levures du vaccin	95
CONCLUSIONS	101
BIBLIOGRAPHIE	103
TABLE DES MATIÈRES	115

